

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Doktorské studium biomedicíny

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



**Disertační práce**

Varianty vybraných kandidátních genů ve vztahu k výsledkům transplantace ledviny

Selected candidate genes variants with respect to the renal transplantation outcomes

Autor: MUDr. Štěpán Bandúr

Školitel: Prof. MUDr. Ondřej Viklický, CSc.

Praha, 2012

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 15.9.2012

MUDr. Štěpán Bandúr

Podpis:

**Identifikační záznam:**

MUDr. BANDŮR, Štěpán. *Varianty vybraných kandidátních genů ve vztahu k výsledkům transplantace ledviny [Selected candidate genes variants with respect to the renal transplantation outcomes]*.

Praha, 2012. Počet stran: 108, počet příloh: 13. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Institut klinické a experimentální medicíny. Školitel: Prof. MUDr. Ondřej Viklický, CSc..

## Abstrakt:

Výsledky transplantace ledviny mohou být ovlivněny genetickými determinantami, variantami genů kódujících proteiny strukturní i regulační funkce, které jsou součástí některých patofyziologických a imunitních procesů. Důležitou roli hrají proteiny ovlivňující biologickou dostupnost imunosupresiv- inhibitorů kalcineurinu a mTOR. Ta je dána aktivitou cytochromu P450IIIa a P-glykoproteinu kódovanými *CYP3A4/CYP3A5* a *ABCB1/MDR1* geny. Jednonukleotidové polymorfismy těchto genů ovlivňují farmakokinetiku imunosupresiv. Haplotypovou analýzou byla testována asociace klinických a laboratorních parametrů s přítomností genových polymorfismů, respektive haplotypů *CYP3A4* -288A/G, *CYP3A5* +6986G/A a *ABCB1/MDR1* +1236C/T, +2677G/T/A, +3435C/T u celkem 1016 pacientů. U pacientů léčených kalcineurinovými inhibitory byl rozvoj akutní rejekce predikován kromě neshody dárce a příjemce v HLA-DR antigenu, opožděným rozvojem funkce štěpu, věkem dárce, také přítomností [*ABCB1/MDR1*+1236C;+2677G;+3435T] haplotypu. Homozygoti pro haplotyp [*CYP3A4*-288A;*CYP3A5*+6986G] dosáhli vyšší biologické dostupnosti takrolimu v prvním týdnu po transplantaci. *ABCB1/MDR1* haplotypy představují modifikátory rizika vzniku akutní rejekce, což naznačuje, že alelickým uspořádáním tohoto genu je ovlivňována aktivita P-glykoproteinu významněji než jednonukleotidovými polymorfismy, nezávisle na farmakokinetických parametrech. Haplotypy *CYP3A4-CYP3A5* determinovaly také variabilitu biologické dostupnosti hladin mTOR inhibitorů. Haplotyp [*CYP3A4*-288AA;*CYP3A5*+6986GA] byl asociován se zvýšeným rizikem vzniku hypercholesterolemie a proteinurie při terapii mTOR inhibitory. Genetická analýza představuje potencionálně v praxi využitelný nástroj k predikci některých klinických a laboratorních parametrů- rejekce transplantovaného orgánu či nežádoucích účinků imunosupresivní terapie po transplantaci ledviny.

**Klíčová slova:** Cytochrom P450; Haplotyp; Kalcineurinové inhibitory; mTOR inhibitory; Transplantace ledviny; P-glykoprotein; Jednonukleotidový polymorfismus; Takrolimus.

## Abstract:

Renal transplantation outcomes might be influenced by genetic determinants, genes encoding structural and regulatory proteins involved in respective pathophysiological and immunological pathways. *CYP3A4/CYP3A5* and *ABCB1/MDR1* genes encoding cytochrome P450III A and P-glycoprotein, proteins determining bioavailability of immunosuppressants- calcineurin inhibitors and mTOR inhibitors, play important role. Polymorphisms in these genes have been suggested to influence immunosuppressants pharmacokinetics and renal transplant outcomes. The association of *CYP3A4* -288A>G, *CYP3A5* +6986G>A, *ABCB1/MDR1* +1236C>T, +2677G>T>A and +3435C>T polymorphisms with clinical and laboratory endpoints was assessed by using haplotype analysis approach in 1016 patients. Except of HLA-DR mismatch, delayed graft function and kidney graft donor age, [*ABCB1/MDR1*+1236C;+2677G;+3435T] haplotype was independent predictor of acute rejection, but did not influence kidney graft survival. Homozygotes for the [*CYP3A4*-288A;*CYP3A5*+6986G] haplotype had higher bioavailability of tacrolimus at week one. *ABCB1/MDR1* haplotypes did not influence pharmacokinetics, but modified the risk of acute rejection, suggesting that allelic arrangement of the genetic loci was a stronger regulator of P-glycoprotein activity than single polymorphisms.

Haplotypes *CYP3A4-CYP3A5* determined variable concentrations and bioavailability of mTOR inhibitors at months one and three. Haplotype [*CYP3A4*-288AA;*CYP3A5*+6986GA] was associated with higher risk of hypercholesterolemia and proteinuria in patients treated with mTOR inhibitors.

Genetic analysis has potential to become a new diagnostic tool for prediction of relevant clinical and laboratory parameters- acute allograft rejection or immunosuppressive therapy side effects in patients after renal transplantation.

**Keywords:** Cytochrome P450; Haplotype; Calcineurin inhibitor; mTOR inhibitor; Renal transplantation; P-glykoprotein; Single nukleotide polymorphism; Tacrolimus.

### **Poděkování:**

Děkuji Prof. MUDr. Ondřeji Viklickému, CSc. za možnost pracovat pod jeho vedením v Transplantační laboratoři PEM IKEM, která byla vynikajícím zázemím umožňujícím vznik předkládané disertační práce. Dále děkuji svým kolegům a spolupracovníkům MUDr. Janu Petráškov, PhD., Ing. Petře Hřibové, PhD., Ing. Ireně Brabcové a Mgr. Evě Girmanové za cenné připomínky, rady a vůbec vznik tvůrčího a motivujícího pracovního prostředí.

V neposlední řadě z celého srdce děkuji své ženě Lubomíře a synovi Šimonovi za jejich trpělivost a lásku.



## Obsah:

1. SEZNAM ZKRATEK.....	12-13
2. ÚVOD.....	14-18
2.1. Transplantace ledviny.....	15-16
2.2. Faktory ovlivňující výsledky transplantace ledviny.....	16-17
2.3. Genetické determinanty výsledků transplantace ledviny.....	17
2.3.1. Varianty genů kódujících cytokiny, chemokiny, jejich receptory a adhezivní molekuly.....	17-19
2.3.2. Varianty genů kódujících antigeny histokompatibilního systému.....	19
2.3.3. Varianty genů kódujících proteiny asociované s procesy oxidativního stresu.....	19-20
2.3.4. Varianty ostatních genů- celogenomové sondy, technologie genového čipu.....	20
2.3.5. Varianty genů kódujících enzymatické a transportní systémy.....	21
2.4. Imunosuprese po transplantaci ledviny.....	21-22
2.4.1. Kalcineurinové inhibitory.....	22-23
2.4.2. mTOR inhibitory.....	23-24
3. FARMAKOGENETIKA KALCINEURINOVÝCH INHIBITORŮ A mTOR INHIBITORŮ.....	25
3.1. Koncept farmakogenetiky.....	25-27
3.2. Klasické kandidátní geny.....	27-28
4. FARMAKOKINETIKA KALCINEURINOVÝCH INHIBITORŮ A mTOR INHIBITORŮ.....	29
4.1. Porovnání farmakokinetických parametrů cyklosporinu A a takrolimu.....	29
4.2. Porovnání farmakokinetických parametrů sirolimu a everolimu.....	29
5. CYTOCHROM P450 A GLYKOPROTEIN P- EXPRESE, STRUKTURA, FUNKCE.....	30-31

6. JEDNONUKLEOTIDOVÉ POLYMORFISMY V GENECH <i>CYP3A4</i> , <i>CYP3A5</i> a <i>ABCB1/MDR1</i> VE VZTAHU K BIOLOGICKÉ DOSTUPNOSTI IMUNOSUPRESIV .....	32
6.1. Kalcineurinové inhibitory .....	32-34
6.2. mTOR inhibitory .....	34-35
7. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ ALELICKÝCH ASOCIAČNÍCH STUDIÍ .....	36-37
8. CÍL STUDIE- HYPOTÉZA .....	38
9. STUDIE .....	39
9.1. Asociace <i>CYP3A</i> a <i>ABCB1/MDR1</i> haplotypů u pacientů po transplantaci ledviny užívajících kalcineurinové inhibitory .....	39
9.1.1. Metody .....	39
9.1.1.1. Soubor pacientů .....	39
9.1.1.2. Stanovení hladiny léků .....	40
9.1.1.3. Detekce jednonukleotidových polymorfismů .....	40-41
9.1.1.4. Statistická analýza .....	41-42
9.1.2. Výsledky .....	43
9.1.2.1. Charakteristika souboru pacientů .....	43
9.1.2.2. Genové polymorfismy .....	43
9.1.2.2.1. Analýza jednotlivých genových lokusů .....	43
9.1.2.2.2. Haplotypová analýza .....	43-45
9.1.2.3. Faktory ovlivňující vznik akutní rejekce a přežití štěpu .....	45-46
9.1.3. Diskuse .....	47-50
9.2. Asociace <i>CYP3A</i> a <i>ABCB1/MDR1</i> haplotypů u pacientů po transplantaci ledviny užívajících mTOR inhibitory .....	51
9.2.1. Metody .....	51

9.2.1.1. Soubor pacientů.....	51-52
9.2.1.2. Stanovení hladiny léků.....	52
9.2.1.3. Detekce jednonukleotidových polymorfismů.....	52
9.2.1.4. Detekce jednonukleotidových polymorfismů.....	52-53
9.2.1.5. Statistická analýza.....	53
9.2.2. Výsledky.....	54
9.2.2.1. Charakteristika soboru pacientů.....	54
9.2.2.2. Efekt terapie mTOR inhibitory na lipidemii a proteinurii.....	54
9.2.2.3. Alelická asociační analýza, analýza <i>CYP3A</i> haplotypů.....	54-55
9.2.2.4. Farmakogenetická studie.....	55-56
9.2.2.5. <i>CYP3A</i> haplotypy ve vztahu k nežádoucím účinkům terapie mTOR inhibitory....	56
9.2.2.6. Farmakologické interakce a konkomitantní farmakoterapie.....	56
9.2.3. Diskuse.....	57-59
10. JEDNONUKLEOTIDOVÉ POLYMORFISMY V GENU <i>AGER</i> VE VZTAHU K HISTOLOGICKÝM NÁLEZŮM V TRANSPLANTOVANÉ LEDVINĚ.....	60
10.1. Metody.....	60
10.1.1. Soubor pacientů, detekce polymorfismů, laboratorní a histologické vyšetření.....	60
10.1.2. Statistická analýza.....	61
10.2. Výsledky.....	61
10.2.1. Charakteristika soboru pacientů, klinické a laboratorní nálezy.....	61-62
10.2.2. Alelická asociační analýza, haplotypová analýza.....	62
10.3. Diskuse.....	62-63
11. ZÁVĚRY.....	64
11.1. Farmakogenetika- imunosuprese kalcineurinovými inhibitory.....	64
11.1.1. Variabilita farmakokinetických parametrů.....	64

11.1.2. Variabilita výsledků transplantace ledviny- riziko akutní rejekce.....	64
11.2. Farmakogenetika- imunosuprese mTOR inhibitory.....	64
11.2.1. Variabilita farmakokinetických parametrů.....	64-65
11.2.2. Variabilita nežádoucích účinků léčby.....	65
11.3. Varianty genu AGER a histologický nález ve štěpu ledviny.....	65
12. POUŽITÁ LITERATURA.....	66-77
13. PŘÍLOHY.....	78-92
14. PUBLIKAČNÍ ČINNOST.....	93-94
15. PŘEDNÁŠKOVÁ ČINNOST, PREZENTACE VÝSLEDKŮ NA KONGRESECH.....	95
16. PŘÍLOHA PUBLIKACÍ.....	96-106

## 1. SEZNAM ZKRATEK

*ABCB1* (ATP Binding Casette Protein 1): gen pro P-glykoprotein

ACE: angiotenzin konvertující enzym

ANOVA: analýza variance- parametrický statistický test

*AGER* (Advanced Glycation Endproducts Receptor): gen pro receptor AGEs

AGEs (Advanced Glycation Endproducts): produkty pokročilé glykace proteinů

AR: akutní rejekce

AT1: receptor angiotenzinu 1

AUC (Area Under Curve): plochy pod křivkou- ukazatel expozice organismu léčivu

CNI: kalcineurinový inhibitor

CyA: cyklosporin A

CYP11A: cytochrom P450

*CYP3A4*: gen pro cytochrom P450- izoenzym 3A4

*CYP3A5*: gen pro cytochrom P450- izoenzym 3A5

DNA: deoxyribonukleová kyselina

Evr: everolimus

FKBP-12 (FK Binding Protein-12): FK vážící protein-12

GM-CSF (Granulocytes Macrophages- Colony Stimulating Factor): stimulační faktor pro  
granulocyty a makrofágy

HLA (Human Leukocyte Antigens): antigeny hlavního histokompatibilitního komplexu

IFN- $\gamma$ : interferon gama

IF/TA: intersticiální fibróza/tabulární atrofie- histologický obraz chronické transplantační  
nefropatie

K/DOQI (Kidney Disease Duality Outcome Iniciative): platforma definující 5 stádií  
chronického renálního onemocnění

*MDR1* (Multidrug Resistance Related Protein 1): gen pro P-glykoprotein- synonymum

*ABCB1*

mRNA: messenger RNA)

mTOR (mammalian Target Of Rapamycin): cytoplazmatická proteinkináza- cílová struktura farmakodynamického efektu sirolimu a everolimu

NFAT (Nuclear Factor Of Activated T Cells): jaderný transkripční faktor aktivovaných T lymfocytů

NODAT (New Onset Diabetes After Transplantation): potransplantační diabetes mellitus

OR (Odds Ratio): podíl šancí- statistický test asociace

PCR (Polymerase Chain Reaction): polymerázová řetězová reakce

P-glycoprotein: glykoprotein P

PRA (Panel Reactive Antipody): panel reaktivní protilátky

RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts): receptor (membránově vázaný) pro AGEs

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism): polymorfismus délky restrikčních fragmentů

RNA: ribonukleová kyselina

ROC (Receiver Operatin Curve): ROC křivka- grafický predikční model

Sir: sirolimus

SNP (Single Nukleotide.Polymorphism): jednonukleotidový polymorfismus

sRAGE (soluble Receptor for Advanced Glycation Endproducts): solubilní forma receptoru pro AGEs

Tac: takrolimus

TxL: transplantace ledviny

## 2. ÚVOD

### 2.1. Transplantace ledviny

Transplantace ledviny představuje vzhledem významnému poklesu mortality pacientů, která je méně než poloviční ve srovnání s pacienty léčenými dialýzou, metodu volby v léčbě chronického renálního selhání [1]. Pro bližší představu lze uvést srovnání přežití pacientů léčených hemodialýzou či peritoneální dialýzou, které v roce 2001 podle dostupných údajů činilo 78% v jednom roce, ale jen 8% v deseti letech léčby [2]. U pacientů léčených transplantací bylo v témže období jednorroční přežití 95% (desetileté 55%) v případě kadaverozní transplantace ledviny, respektive 98% (desetileté 75%) v případě transplantace ledviny od žijícího dárce [2]. Výsledky léčby chronického renálního selhání transplantací ledviny se však významně nezměnily ani v následujícím desetiletí [3].

Nezbytným předpokladem pro úspěch transplantace solidních orgánů obecně je navození stavu imunosuprese, což představovalo po dlouhá léta hlavní problém klinické transplantologie [4]. V současnosti představuje udržovací imunosuprese založená na použití kalcineurinových inhibitorů (CNI) dominantní přístup po transplantaci solidních orgánů [5, 6]. Jeho alternativou je imunosupresivní terapie mTOR inhibitory [7]. Imunosuprese kalcineurinovými inhibitory přispěla k významnému zlepšení krátkodobých výsledků transplantace ledviny, s významným zlepšením jednorročního přežití štěpů i pacientů, které nyní činí, jak již bylo uvedeno, více než 90% [5]. Došlo také k významnému poklesu četnosti některých komplikací transplantace, zejména výskytu akutní rejekce, která podle aktuálně dostupných statistik vzniká v 5-20% případů [3] a která, byť již jen zřídka vede k selhání funkce štěpu, nadále zůstává důležitým negativním prediktorem dlouhodobého přežití transplantované ledviny [8]. Významným klinickým problémem zůstává rovněž fakt, že dlouhodobé přežití štěpu se navzdory pokrokům v možnostech udržovací imunosuprese za posledních několik let podstatně nezlepšilo [9].

Tato skutečnost je velmi pravděpodobně zapříčiněna rozvojem některých závažných komplikací doprovázejících časně i pozdní potransplantační období, které vedou jak ke snížení funkce, respektive úplnému selhání funkce transplantované ledviny, tak i k dalším komplikacím, jejichž následkem je úmrtí pacienta s funkčním štěpem. To představuje významnou příčinou ztráty štěpu a tím také zásadní klinický, etický a ekonomický problém [3].

## 2.2. Faktory ovlivňující výsledky transplantace ledviny

Hlavní problémy ve vztahu k přežití pacientů po transplantaci ledviny představují hypertenze, potransplantační diabetes mellitus (NODAT) a dyslipidemie, jejichž výsledkem je zvýšení kardiovaskulární morbidity a mortality [10]. Bylo prokázáno, že přibližně třetina příjemců transplantované ledviny umírá v období po prvním roce po transplantaci právě na onemocnění kardiovaskulárního aparátu. [10]. Novým významným rizikovým faktorem ischemické choroby srdeční u pacientů po transplantaci ledviny představuje funkce štěpu jako taková, zatímco klasické rizikové faktory jako například hypertenze či kouření se stejně významnou měrou neuplatňují [11]. Délku přežití štěpu ledviny podle současných znalostí výrazně ovlivňuje vznik chronické transplantační nefropatie, virová onemocnění, zejména polyomavirová infekce (PVAN), a rekurence základního onemocnění- glomerulonefritidy [12, 13]. Jako významný rizikový faktor selhání funkce štěpu byl podle novějších poznatků identifikován potransplantační diabetes mellitus [14]. Chronická transplantační nefropatie, která představuje komplexní změny ve tkáni štěpu charakterizované intersticiální fibrózou a tabulární atrofií (IF/TA) [15, 16], byla podle dříve převažujícího názoru determinována jak aloantigen dependentními faktory (např. neshoda v HLA antigenech, frekvence panel reaktivních protilátek), tak aloantigen independentními faktory (např. ischemicko reperfuze poškození, opožděný rozvoj funkce štěpu) [15, 17]. Podle novějších pozorování jsou však



hlavními rizikovými faktory vzniku fibrozy v transplantované ledvině opakované rejekce, rekurence glomerulonefritidy a polyomavirová infekce [13].

Lze tedy konstatovat, že faktorů, které mají bezprostřední a kauzální vliv na výsledky transplantace ledviny je celá řada, a že byl učiněn značný pokrok v procesu identifikace jednotlivých rizikových faktorů rejekce transplantované ledviny, některých dalších komplikací vyskytujících se v potransplantačním období a ve výsledku tedy také přežití štěpu i pacientů po transplantaci.

Potencionálně významnou skupinou prediktorů klinického vývoje po transplantaci ledviny představují genetické faktory. Tyto se mohou uplatňovat jednak jako přímé kauzální faktory, častěji však představují komplexní modifikátory klinického vývoje, které nepůsobí osamoceně, ale v komplikované souhře s celou řadou dalších genetických determinant, jak bylo prokázáno některými novějšími expresními analýzami [18]. Z těchto důvodů může být na příslušné geny a jejich varianty nahlíženo jako na potencionální biomarkery klinického vývoje, například funkce transplantované ledviny, a takto také mohou být v klinické praxi používány pro diagnostiku a léčbu některých stavů vzniklých po transplantaci.

### 2.3. Genetické determinanty výsledků transplantace ledviny

#### 2.3.1. Varianty genů kódujících cytokiny, chemokiny, jejich receptory a adhezivní molekuly

Vzhledem ke komplexnímu charakteru procesu vzniku a progresu rejekce transplantovaného orgánu, ve kterém hrají roli jak polymorfní lokusy histokompatibilitního systému (HLA), tak i mnohé cytokiny a jejich receptory, případně adhezivní molekuly ovlivňující proces zánětu a poškození buněk, představují právě tyto molekuly faktory ovlivňující riziko vzniku rejekce, respektive dysfunkce štěpu [19-21]

Expresními analýzami i experimenty na zvířecích modelech byla prokázána souvislost míry exprese některých cytokinů a jejich receptorů s histologickými nálezy charakterizujícími poškození tkáně zánětem (intersticiální fibróza, glomeruloskleróza) [22-25]. Za kandidátní

geny v této souvislosti mohou být považovány geny kódující prozánětlivé cytokiny tumor nekotizující faktor alfa (TNF-  $\alpha$ ), transformující růstový faktor beta (TGF- $\beta$ ), cytokin RANTES (RANTES- regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted), chemokin MCP-1 (MCP-1- monocyte chemotactic protein-1), ale také některé receptory chemokinů, například molekuly CCR2 a CCR5, jejichž vztah k patofyziologii procesu rejekce byl některými studiemi rovněž dokumentován [26].

Dominantním problémem alelických asociačních analýz zabývajících se nejen výše uvedenými molekulami však zůstává značná nekonzistentnost a omezená reproducibilita výsledků, ke kterým jednotlivé studie dospěly. Dobře prokázána byla asociace genového polymorfismu a klinického nálezu, přežití štěpu, v případě chemokinu CC, který se uplatňuje v procesu rejekce transplantované ledviny tím, že působí jako chemoatraktant pro aloreaktivní CCR5- pozitivní lymfocyty infiltrující tkáň štěpu. Jednonukleotidový polymorfismus genu pro receptor 5 chemokinu CC (CCR5), respektive jeho alela CCR5 $\Delta$ 32 charakterizovaná delecí 32 párů bází (bp) zodpovědná za inaktivaci tohoto receptoru představuje determinantu délky přežití štěpu [27]. Jiným příkladem metodicky adekvátně provedené analýzy avšak s negativními závěry je studie polymorfních genových lokusů vybraných adhezivních molekul (L-selektin, PECAM- platelet endothelial cell adhesion molecule, ALCAM- activated leukocyte cell adhesion molecule), jejichž funkčním korelátem měla být různá míra infiltrace tkáně transplantovaného orgánu aloreaktivními lymfocyty. Při validaci závěrů této analýzy provedené na relativně rozsáhlé kohortě pacientů, však nebyly statisticky signifikantní výsledky potvrzeny v kontrolní skupině [28].

Přestože bylo učiněno mnoho pokusů o identifikaci polymorfismů lokalizovaných v regulačních i prepisovaných oblastech genů pro cytokiny a další molekuly ovlivňující imunitní reakce s prokázaným vlivem na expresi daného genu, těch které by byly v praxi

využitelné jako genetické markery, například rejekce transplantované ledviny, zůstává i s ohledem na četné metodologické problémy mnoha klinických studií velmi málo [29].

### 2.3.2. Varianty genů kódujících antigeny histokompatibilitního systému

Hlavní histokompatibilitní systém (MHC- main histocompatibility system), respektive HLA molekuly (HLA- human leucocyte antigens), představují proteiny s funkcí markeru tělu vlastní buňky. Tyto antigeny jsou také zodpovědné za vývoj pro jedince charakteristického repertoáru T lymfocytů. Přestože je v běžné klinické praxi zatím používáno serologické stanovení HLA antigenů, molekulárně genetické vyšetření nyní nezbytné pro potřeby transplantace kmenových buněk, bude pravděpodobně v budoucnu potřebné i při transplantaci solidních orgánů, zejména v souvislosti s diagnostikou specifických anti-HLA i anti-nonHLA protilátek [30]. Studium genové variability v HLA lokusech, případně i v genových oblastech regulujících transport a vlastní prezentaci alogenních proteinů za pomoci HLA (MHC) molekul (TAP- transporters associated with antigen processing, LMP- low molecular mass polypeptides) [31] představuje další důležitou kapitolu výzkumu genových variant, respektive identifikace genetických markerů v transplantační medicíně.

### 2.3.3. Varianty genů kódujících proteiny asociované s procesy oxidativního stresu

Již dlouhou dobu je známo, že se produkty pokročilé glykace proteinů (AGE) prostřednictvím svých receptorů (RAGE) uplatňují v patogenezi mnoha onemocnění- poškození cév včetně aterosklerozy, komplikací diabetes mellitus či některých zánětlivých onemocnění [32, 33]. Role RAGE byla také diskutována v souvislosti s procesem ischemicko reperfuze poškození po transplantaci [34] a dále také v procesu aloreaktivity imunitního systému, respektive rejekce či mortality pacientů po transplantaci [35, 36]. Polymorfismy genu *AGER* (-429T/C, -374T/A, Gly82Ser and 2184A/G) u kterých byl prokázán funkční vztah k míře exprese genu *AGER* byly zkoumány s ohledem na možnou asociaci s histologickými nálezy ve tkáni transplantované ledviny i přežití štěpu budou podrobněji

diskutovány níže [37]. Dalšími kandidátními geny uplatňujícími se v procesu buněčného poškození vyplývajících z oxidativního stresu představuje gen pro hemoxygenasu 1 (HO-1) či některé matrix metaloproteinasy (MMP-9, MMP-2). Studium vztahu jak variability repetitivních sekvencí, tak i jednonukleotidových polymorfismů v těchto genech k výsledkům transplantace solidních orgánů však nepřineslo jednoznačné závěry [38-41].

#### 2.3.4. Varianty ostatních genů- celogenomové sondy, technologie genového čipu

Recentně bylo identifikováno za pomoci technologie genového čipu (Affymetrix GeneChip) devět jednonukleotidových polymorfismů v genech XPC, CYP2C9, PAX4, MTRR a GAN asociovaných s rozvojem akutní toxicity imunosupresivní terapie kalcineurinovými inhibitory [42]. Tyto geny se účastní různých procesů regulace buněčné struktury a funkce jako je oprava poškozené DNA (gen *XPC*- xeroderma pigmentosum, complementation group C) [43], buněčný vývoj a diferenciace řízené specifickým transkripčním faktorem PAX4 (gen *PAX4*- paired box) [44, 45], ale i regulace koncentrace homocysteinu (gen *MTRR*- 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase; v českém písemnictví *MTHFR*- methylenetetrahydrofolát reduktáza), u kterého byla prokázána asociace s mnoha různými patologickými stavy, včetně onemocnění kardiovaskulárního aparátu, ale i funkce transplantované ledviny [46, 47]. Z patofyziologického hlediska je pozoruhodná asociace polymorfismu CYP2C9\*3 s nefrotoxitou CNI. Tento enzym katalyzuje syntézu derivátů kyseliny epoxyeicosatetraenové, které hyperpolarizací membrány buněk hladkého svalu vedou k vazodilataci, ale které se uplatňují také v procesu angiogeneze či inhibice zánětu [48]. Polymorfismus CYP2C9\*3 determinuje velmi nízkou aktivitu enzymu, respektive produkci specifických eikosanoidů, a tedy ztrátu schopnosti vazodilatace, jejímž důsledkem je snížení krevního průtoku glomerulem a snížení glomerulární filtrace [49].

### 2.3.5. Varianty genů kódujících enzymatické a transportní systémy

Další skupinou genetických faktorů ovlivňujících osud transplantované ledviny jsou jednonukleotidové polymorfismy genů pro izoenzymy cytochromu P450 *CYP3A4* a *CYP3A5* odpovídajících za biotransformaci imunosupresiv, respektive polymorfismy genu *ABCB1/MDR1* kódujícího P-glykoprotein, významný membránový transportér, čímž ovlivňují farmakokinetiku imunosupresiv [50]. Přestože bylo učiněno mnoho pokusů o identifikaci genomických biomarkerů právě v genech kódujících výše uvedené proteiny, lze zatím pouze polymorfní alelu *CYP3A\*5* považovat za biomarker biologické dostupnosti takrolimu, jehož dávkování může být případně na základě přítomnosti této alely modifikováno [51].

Ve snaze o identifikaci jednotlivých rizikových faktorů selhání funkce štěpu ledviny, jejíž součástí je i výzkum genetických determinant- variant genů pro cytokiny, chemokiny, RAGE a další výše uvedené molekuly, ale také výzkum v oblasti farmakogenetiky, respektive farmakogenomiky, je v souvislosti s uvedenými příčinami deteriorace funkce štěpu ledviny podstatný adekvátní výběr sledované klinické proměnné [52, 53]. Fakt, že podle dostupných údajů představuje akutní rejekce klinický parametr relevantní pro střednědobý horizont spíše než pro celkové, dlouhodobé přežití štěpu, situaci poněkud komplikuje [54]. Přestože existuje biologicky relevantní patofyziologický korelát kauzálního vztahu akutní rejekce a chronické transplantační nefropatie, tedy intersticiální fibrózy a tubulární atrofie, respektive selhání funkce štěpu ledviny, chybí přesná kvantifikace predikční síly daného biomarkeru jako takového i ve vztahu k ostatním potencionálním biomarkerům [53]. Tato okolnost, společně s dalšími metodologickými problémy, činí výsledky mnohých provedených, nejen farmakogenetických, studií obtížně aplikovatelné v rutinní klinické praxi.

### 2.4. Imunosuprese po transplantaci ledviny

Imunosupresi po transplantaci solidních orgánů lze rozdělit na indukční, jejímž smyslem je podání monoklonálních či polyklonálních protilátek, a udržovací, která je

založena po perorální léčbě preparáty s imunosupresivním účinkem [15]. Dále bude věnována pozornost dvěma základním skupinám v současnosti používaných imunosupresiv-kalcineurinovým inhibitorům a mTOR inhibitorům.

#### 2.4.1. Kalcineurinové inhibitory

Kalcineurinové inhibitory- cyklosporin A (CyA) a takrolimus (Tac) jsou základními komponentami udržovací imunosuprese po transplantaci ledviny [6]. Jejich zavedení do klinické praxe v letech 1983- cyklosporin A, respektive 1994- takrolimus [55] znamenalo významné zlepšení výsledků transplantace solidních orgánů [56]. Navzdory odlišné chemické struktuře se cyklosporin A, undekapeptid produkovaný ascomycetou [Tolypocladium inflatum](#), a makrolid takrolimus, vznikající metabolismem *Streptomyces tsukubaensis*, vyznačují podobnými farmakodynamickými charakteristikami [15]. Mechanismus jejich imunosupresivního účinku spočívá v inhibici aktivity kalcineurinu- cytoplazmatické fosfatázy, která je zodpovědná za defosforylaci jaderného transkripčního faktoru aktivovaných T-lymfocytů (NFAT), který dále ovlivňuje expresi genů pro některé cytokiny, kdy zvláště interleukin-2 představuje specifický růstový faktor T-lymfocytů [15, 57]. Inhibice kalcineurinu se uskutečňuje prostřednictvím vazby na cytoplazmatický receptor cyklofilin v případě cyklosporinu A, respektive vazbou na takrolimus (FK506) vázící protein (FKBP) v případě takrolimu [15]. T-lymfocyty představují vlastní efektorový mechanismus v patobiologii rejekce transplantovaného orgánu. Cyklosporin A i takrolimus se vyznačují úzkým terapeutickým rozmezím [58, 59] s vysokým potenciálem vzniku akutní rejekce při nedosažení cílových hladin [60, 61] na jedné straně a rozvojem klinicky významných nežádoucích účinků vznikajících při vyšších hladinách na straně druhé [12].

Při terapii kalcineurinovými inhibitory je dále pozorována významná intraindividuální i interindividuální variabilita farmakokinetických parametrů, ze kterých vyplývají problémy při stanovování optimální úvodní dávky a dále nutnost častého monitorování hladin léčiv [62-64].

Bylo prokázáno, že navzdory terapeutickému monitorování hladin takrolimu v prvních dvou týdnech po transplantaci ledviny a adekvátním úpravám dávek léku, byla u pacientů s určitou genetickou predispozicí, charakterizovanou variabilní expresí genu kódujícího cytochrom P450 CYP3A5, přítomna nižší průměrná hladina léku, a dále že v této skupině příjemců transplantované ledviny došlo významně později k dosažení cílových hladin, ve srovnání s kontrolní skupinou [65].

Lze konstatovat, že interindividuální, variabilita odpovědi na podané léčivo je v obecné populaci významnější než variabilita intraindividuální [66], a že genetické faktory, tedy varianty genů kódujících proteiny ovlivňující farmakokinetiku i farmakodynamiku léčiv, jsou zodpovědné za 20 až 95% variability v biologické dostupnosti léčiv či biologické odpovědi na jejich podání [64]. Ne jinak je tomu i v případě biologické dostupnosti kalcineurinových inhibitorů [62]. Biologickou dostupnost CNI ovlivňují jednak faktory vnějšího prostředí, jako je strava, věk, abusus, farmakologické interakce, aktuální zdravotní stav pacienta, ale také hodnoty některých laboratorních parametrů- hematokritu či sérového albuminu [63, 67-69]. Genetickou predispozici k variabilní farmakokinetice CNI představují varianty genů kódujících transportní proteiny a enzymy podílející se na procesech absorpce, distribuce a eliminace těchto imunosupresiv [70].

#### 2.4.2. mTOR inhibitory

Reprezentanty této skupiny látek, které byly jako imunosupresiva do klinické praxe uvedeny později než kalcineurinové inhibitory jsou sirolimus a everolimus. Sirolimus, objevený v sedmdesátých letech na Velikonočních ostrovech, je produktem metabolismu bakterie *Streptomyces hydropiscus* a svou strukturou představuje lakton, který se podobně jako takrolimus váže na intracelulární vazebný protein FKBP-12 [71]. Ve vazbě na tento protein patřící do skupiny imunofilinů inhibuje aktivitu serin-threoninové kinázy mTOR (mammalian target of rapamycin) [71, 72]. Tento enzym ovlivněním exprese genů pro cyklin a

cyklin dependentní kinázy představuje základní regulační mechanismus buněčného cyklu, což je spolu s ovlivněním exprese genů pro interleukin 2 a interleukin 4, podstatou imunosupresivního působení mTOR inhibitorů [73].

Everolimus, 40-O-(2-hydroxyethyl)- derivát sirolimu, má podobné farmakodynamické vlastnosti, avšak jeho afinita k FKBP-12 je asi šestkrát nižší, a představuje tedy možnou alternativu k terapii sirolimem [71]. Oba tyto preparáty se vyznačují nižší nefrotoxicitou ve srovnání s kalcineurinovými inhibitory [74], mají rovněž úzké terapeutické rozmezí a je u nich přítomna značná interindividuální variabilita farmakokinetických parametrů, která vyžaduje monitorování hladin [75, 76]. Klinicky nejvýznamnějšími nežádoucími účinky asociovanými s terapií mTOR inhibitory jsou anémie, trombocytopenie, dyslipidemie-hypertriacylglycerolemie a hypercholestrolemie, proteinurie či vzácně rozvoj intersticiální pneumonie [71, 77, 78]. Na druhé straně byl prokázán protektivní vliv mTOR inhibitorů ve smyslu zpomalení progresu chronické transplantační nefropatie a zlepšení jeho funkce a dále snížení rizika vzniku nádorové nemoci po transplantaci ledviny [7]. Bylo prokázáno, že variabilita farmakokinetických parametrů mTOR inhibitorů je ovlivňována aktivitou cytochromu P450 a P-glykoproteinu [79-81].



### 3. FARMAKOGENETIKA KALCINEURINOVÝCH INHIBITORŮ A mTOR INHIBITORŮ

#### 3.1 Koncept farmakogenetiky

Farmakogenetika se zabývá výzkumem genetické predispozice jedinců ve vztahu k variabilní odpovědi na podané léčivo. Tento termín jako první zmiňuje ve své práci z roku 1959 Friedrich Vogel [82]. Jako samostatný vědní obor však byla anticipována již průkopnickými pracemi Sira Archibalda Garroda z počátku 20. století [83], který na základě výzkumu alkaptonurie a sulfonalem indukované porfyrie odvodil koncept vrozených metabolických poruch způsobených defektem enzymu [84]. Dle Meyera připravil Garrod zavedením pojmu „chemické individuality“ půdu pro další výzkum zaměřující se ve svém důsledku na rozvoj individualizované farmakoterapie [85]. Podle dostupných údajů nelze říci, že by Garrod jím pozorované zákonitosti interpretoval v intencích monogenní dědičnosti. Koncept mendelovské genetiky byl na Garrodova pozorování aplikován nejspíše Williamem Beatsonem, propagátorem díla Johanna Gregora Mendla a také autorem termínu genetika [83].

Podle přesnější definice studuje farmakogenetika variability sekvence DNA ve vztahu k účinku farmakoterapie, respektive farmakogenomika zkoumá vliv variability sekvence DNA a RNA na účinek podaného léku [86]. Toto zkoumání je vedeno snahou o nalezení příslušných kandidátních genů, které by mohly sloužit jako genomické biomarkery predikující účinek podaného léčiva na daný organismus [87]. Genomickým biomarkerem je míněna měřitelná charakteristika DNA a nebo RNA, která je indikátorem normálního nebo patologického biochemického procesu či odpovědi organismu na podanou látku [86].

Farmakogenomika představuje díky kompletnímu zmapování lidského genomu, zvláště pak velmi podrobné znalosti lokalizace jednonukleotidových polymorfismů (SNPs- Single nukleotide polymorphisms), v kombinaci s dostupnými a efektivními detekčními

systemy, perspektivní nástroj ve snaze o zavedení personalizované medicíny [88]. Snaha o nalezení genomického biomarkeru pokročila zřejmě nejdále v případě terapie warfarinem, jehož biologický účinek, měřený jako hodnota INR (International Normalized Ratio), koreloval s přítomností genetických variant cytochromu P-450 2C9 (*CYP2C9*), respektive vitamin K epoxid reduktázy (*VKORC1*) [89, 90]. Výsledky těchto i dalších prací vedly k tomu, že FDA (Food and Drug Administration) v roce 2007 akceptovala možnost volby dávky warfarinu právě na základě pacientova konkrétního genotypu, respektive haplotypu [91]. Dalším příkladem FDA již akceptovaného genomického biomarkeru jsou SNPs v genu pro thiopurin-S-methyl transferázu ve vztahu k terapii azathioprinem (Imuran) a predikce nežádoucích účinků této léčby při nižší míře biotransformace [92]. Od roku 2008 je díky aktivitě FDA k dispozici stále aktualizovaný seznam tzv. „validních genomických biomarkerů“, jejichž stanovení je doporučováno jako pomocný nástroj umožňující správné dávkování léků [93].

Budoucí výzkum na poli farmakogenomiky se bude nepochybně uskutečňovat v intencích aplikace celogenomových asociačních studií [94]. Tyto studie, koncipované jako studie případů a kontrol, se zaměřují na identifikaci potencionálních nových kandidátních genů, respektive skupin SNPs organizovaných do takzvaných clusterů, které představují potencionální nové genomické biomarkery asociované s příslušným fenotypem. Tento přístup, který spíše než potvrzení určité testované hypotézy, generuje hypotézy nové, vyžaduje nejen specifický interpretativní přístup z hlediska statistického (hladina statistické významnosti je zde konsensuálně stanovena jako  $P < 1,5 \times 10^{-7}$ ), ale i z hlediska biologické relevance [94, 95].

Přes značnou snahu o implementaci farmakogenetických dat do rutinně užívaných rozhodovacích algoritmů, zvláště v případě warfarinu či clopidogrelu, nelze říci, že by došlo k významnému zpřesnění použitých predikčních modelů a ovlivnění výskytu významných

klinických sledovaných parametrů. Zřejmě teprve výsledky prospektivních, randomizovaných, kontrolovaných klinických studií přinesou kýžený posun [96-98].

### 3.2. Klasické kandidátní geny

Funkční systémy zodpovědné za variabilitu farmakokinetických a farmakodynamických parametrů lze v obecné rovině rozdělit na enzymy, transportéry a HLA molekuly [99]. Kandidátní geny zkoumanými v oblasti transplantační medicíny byly geny kódující enzymové a transportní systémy, které ovlivňují absorpci, biotransformaci a eliminaci kalcineurinových inhibitorů a mTOR inhibitorů. Pozornost byla věnována zejména funkci a klinické relevanci jednonukleotidových polymorfismů kódujících i regulačních oblastí genů pro izoenzymy cytochromu P450 CYP3A4 a CYP3A5 a membránových transportních proteinů patřících do skupiny ATP-vážících membránových transportérů (ATP-binding cassette (ABC) proteins). Nejvýznamnějším zástupcem skupiny ABC transportérů je v souvislosti s biologickou dostupností imunosupresiv P-glykoprotein (P-gp) kódovaný *ABCB1/MDR-1* genem (multidrug resistance-related gene). Variabilita exprese těchto genů, respektive aktivity jimi kódovaných proteinů, představuje podstatu farmakogenetického konceptu v transplantační medicíně, která do značné míry vysvětluje pozorování různých fenotypů biologické dostupnosti kalcineurinových inhibitorů (27-29). Maximum variability farmakokinetických parametrů cyklosporinu a takrolimu se uplatňuje na úrovni absorpce a biotransformace (30, 31). Tyto procesy jsou ovlivňovány právě enzymatickou aktivitou cytochromů CYP3A4 a CYP3A5 a transportní aktivitou P-glykoproteinu. Kalcineurinové inhibitory i mTOR inhibitory představují substráty CYP3A a P-glykoproteinu (32, 33), jejichž aktivitou je ovlivňována biologická dostupnost těchto imunosupresiv jejich biotransformací v játrech a absorpci ve střevě [79, 81].

Údaje hodnotící míru příspěvku jednotlivých jednonukleotidových polymorfismů na interindividuální variabilitu farmakokinetických parametrů však doposud zůstávají nejednoznačné [100].

#### 4. FARMAKOKINETIKA KALCINEURINOVÝCH INHIBITORŮ A mTOR INHIBITORŮ

Základním posuzovaným farmakokinetickým parametrem nemohla být v případě níže diskutované studie, která byla koncipována jako retrospektivní studie případů a kontrol, plocha pod křivkou koncentrace (AUC). Tento parametr byl nahrazen parametrem definujícím biologickou dostupnost- poměrem údolní hladiny léčiva vztahované na podanou dávku a kilogram hmotnosti pacienta (C/D/kg). V případě takrolimu bylo prokázáno, že u pacientů po transplantaci ledviny údolní hladiny velmi dobře korelují s celkovou expozicí léčivu definovanou jako AUC [101].

##### 4.1. Porovnání farmakokinetických parametrů cyklosporinu A a takrolimu

Biologická dostupnost obou kalcineurinových inhibitorů je srovnatelná a představuje  $22 \pm 6\%$  v případě takrolimu (Prograf- Astellas, Praha, Česká republika), respektive  $30\%$  (range 10-89%) v případě cyklosporinu A (Sandimmun Neoral- Novartis, Praha, Česká republika) [102]. Obě léčiva se vyznačují silnou vazbou na bílkoviny plazmy, která činí více než  $90\%$  a i distribuční objem je srovnatelný ( $1,41$  l/kg- takrolimus vs.  $3-5$  l/kg- cyklosporin A) [102]. Vzhledem k řádovým rozdílům ve velikosti dávkování obou léků je přítomen i významný rozdíl v parametrech popisujících eliminaci takrolimu a cyklosporinu A ( $AUC = 206,6$  ng/ml/h vs.  $18,17$  ng/ml/h;  $C_{MAX} = 16,0$  ng/ml vs.  $4,09$  ng/ml), eliminační poločas je  $37,6$  h (takrolimus) a  $8,4$  h (cyklosporin A) [102].

##### 4.2. Porovnání farmakokinetických parametrů sirolimu a everolimu

Ze srovnáním základních farmakokinetických parametrů sirolimu a everolimu vyplývá, že hodnoty  $C_{MAX}$  (ng/ml),  $AUC_{24}$  (ng/h/ml) jsou při dávkování  $2$  mg/den (sirolimus), respektive  $0,75$  mg/den (everolimus) přibližně poloviční u sirolimu v porovnání s everolimem ( $12,2 \pm 6,2$  vs.  $21,6 \pm 4,2$ ;  $158 \pm 70$  vs.  $228 \pm 87$ ). Biologický poločas ( $t_{1/2}$  (h)) je naopak v případě sirolimu dvojnásobný ( $63 \pm 16,5$  vs.  $28 \pm 7$ ), což určuje i odlišné dávkovací schéma obou preparátů. Biologická dostupnost je u sirolimu rovněž vyšší ( $27\%$  vs.  $14\%$ ) [102, 103].

## 5. CYTOCHROM P450 A GLYKOPROTEIN P- EXPRESE, STRUKTURA, FUNKCE

Monooxygenázy systému cytochromu P450 jsou hemoproteiny, které reprezentují významný podíl funkční enzymatické kapacity jater [104, 105] a jsou podle dostupných údajů zodpovědné za syntézu a metabolismus řady tělu vlastních látek (cholesterol, mastných kyselin, sterolů, vitamínu D a dalších) i metabolismus významného množství xenobiotik a léčiv (39, 40). Právě hydroxylace, katalyzovaná systémem cytochromu P450 lokalizovaným v endoplazmatickém retikulu hepatocytů, představuje dominantní typ reakce fáze I metabolismu xenobiotik (40, 41). Genový lokus *CYP3A* zahrnující čtyři geny *CYP3A43*, *CYP3A4*, *CYP3A5* a *CYP3A7* a dva pseudogeny *CYP3A5P1* a *CYP3A5P2*, je lokalizován na dlouhém raménku 7. chromosomu (7q21.3- 7q22.1) (<http://omim.org/entry/606534>; 124010; 605325; 605340).

Cytochrom P450, izoenzym 3A4, byl poprvé identifikován v jaterní tkáni v roce 1985 [106]. Gen *CYP3A4* byl klonován o rok později [107], je lokalizovaný na pozici 7q22.1, má rozsah 27,205 kBp a je transkribován do mRNA o velikosti 2011 bází (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1576>). Enzym CYP3A4 má velikost 52,0 kD a je tvořen 504 aminokyselinami [107]. Exprese genu je indukována mnoha noxami, včetně léků, prostřednictvím vazby těchto látek na jaderný receptor PXR (pregnanový X receptor), který se jako tzv. cis-působící element váže na response element (nifedipin-specific response element-NFSE) promotoru *CYP3A4* genu [108]. Tento mechanismus je molekulárně biologickým korelátem lékových interakcí.

Významnou genovou variantou asociovanou s *CYP3A4* genem je jednonukleotidový polymorfismus lokalizovaný právě v nifedipin-specific response elementu (NFSE) genového promotoru, objevený Rebbeckem [109] v souvislosti s výzkumem karcinomu prostaty, a který zároveň představuje jeden z níže diskutovaných kandidátních polymorfismů.

Cytochrom P450, izoenzym 3A5, byl definován v roce 1989. Gen *CYP3A5* o rozsahu 31,809 kBp je exprimován jako protein o velikosti 52,5 kD, který svou primární strukturou

vykazuje významnou homologii s izoenzymem CYP3A4 [110]. Je transkribován do celkem 8 variant mRNA, z nichž pouze varianty 1 a 2 o rozsahu 1726 Bp, respektive 1077 Bp představují varianty funkční. Z hlediska variability genové exprese je podstatný vznik zkráceného transkriptu o velikosti 132 bází, který je tvořen v důsledku alternativního sestřihu primárního transkriptu mRNA způsobeného jednonukleotidovým polymorfismem v exonu 3B *CYP3A5* genu (variantní alela *CYP3A5\*3*) [111].

P-glykoprotein objevený v polovině 80. let [112] je glykoprotein kódovaný *ABCB1/MDR1* genem lokalizovaným rovněž na 7. chromosomu (7q21.1). Primární strukturu P-gp. představuje 1280 aminokyselinových zbytků [113]. Tento transportní protein patří do skupiny ATP vázajících transportérů, která čítá celkem 47 proteinů [114]. Terciární strukturu proteinu představuje 12 transmembránových oblastí a dvě ATP vážící domény, které navzájem konstituují strukturu schopnou transportovat množství hydrofobních, tělu vlastních látek (např. steroidy, lipidy, peptidy) i xenobiotik [114-116]. Objev proteinu i příslušného kódujícího genu, respektive jejich názvy odvozené od pojmů „permeability“, v případě P-glykoproteinu, a „multidrug resistance“, v případě MDR genu, souvisejí s výzkumem nádorových buněk s fenotypem mnohočetné lékové rezistence (multidrug resistance, MDR), které se vyznačovaly značnou rezistencí k chemoterapii [116].

## 6. JEDNONUKLEOTIDOVÉ POLYMORFISMY V GENECH *CYP3A4*, *CYP3A5* a *ABCB1/MDR1* VE VZTAHU K BIOLOGICKÉ DOSTUPNOSTI IMUNOSUPRESIV

### 6.1. Kalcineurinové inhibitory

Jednou z prvních genových variant zkoumaných v souvislosti s terapií kalcineurinovými inhibitory byl na základě výsledků in vitro studií polymorfismus *CYP3A4* (-289A>G) lokalizovaný v regulační oblasti izoenzymu CYP3A4 cytochromu P450 [117]. Jednonukleotidový polymorfismus se nachází ve výš diskutovaném proximálním elementu promotoru *CYP3A4* genu, v cis-regulační sekvenci NFSE (responsivní element) [118], kde způsobuje záměnu baze adeninu za guanin s následným ovlivněním genové exprese cytochromu [109]. Asociace tohoto polymorfismu s příslušným farmakokinetickým fenotypem, zůstává ne zcela jednoznačně určena [117, 119, 120] a na základě současných znalostí lze říci, že podíl tohoto SNP na farmakogenetiku kalcineurinových inhibitorů je spíše méně významný [121-123]. Bylo však prokázáno, že existuje asociace mezi *CYP3A4*\*1B alelou a hladinami takrolimu [124], respektive eliminací cyklosporinu A [125].

Další relevantní polymorfismus je lokalizován v pozici 6986 intronu 3 genu kódujícího izoenzym CYP3A5, který vede k záměně baze adeninu (A) za guanin (G) (6986A>G). Tímto vznikají dvě variantní alely označované *CYP3A5*\*1 (alela 6986A) a *CYP3A5*\*3 (alela 6986G), kdy *CYP3A5*\*1 je konsenzuálně označována jako divoká alela (wild-type), jež podmiňuje syntézu funkčního proteinu. Naopak přítomnost alely *CYP3A5*\*3 vede k vytvoření předčasného stop kodonu a vzniku místa, kde dochází k aberantnímu sestřihu- zkrácení primárního genového transkriptu- mRNA (SV1- *CYP3A5*). Z toho vyplývá alterace funkce proteinu zkráceného na pouhých 102 aminokyselin z normálního celkového počtu 502 [111]. V případě tohoto polymorfismu existuje značná variabilita ve frekvenci jeho zastoupení mezi jednotlivými etniky, přičemž u kavkazského etnika je divoká alela (*CYP3A5*\*1) přítomna přibližně ve 30% [111]. Z toho vyplývá, že u většiny bělochů je



přítomna variantní alela CYP3A5\*3 v homozygotní konstituci [126], a že tito, jak bylo opakovaně ukázáno, vyžadují k dosažení účinných hladin imunosuprese signifikantně nižší dávky takrolimu než nositelé alely CYP3A5\*1, u kterých je exprimován funkční protein CYP3A5 [87, 127-131]. V případě cyklosporinu A nepanuje obdobná shoda v otázce vlivu zmíněných CYP3A polymorfismů na jeho biologickou dostupnost [132-134].

Glykoprotein P je membránový transportní systém, který vedle cytochromu P450 představuje další významný faktor ovlivňující farmakokinetiku kalcineurinových inhibitorů [114, 135]. Tento transportér jehož aktivita je závislá na energii získané štěpením ATP se podílí na přenosu celé řady substancí z prostoru intracelulárního do prostoru extracelulárního a je ve zvýšené míře exprimován v tzv. bariérových tkáních, jako je například hematoencefalická bariéra, játra či střevní epitel [114]. Exprese *ABCB1/MDR1* genu, respektive celková aktivita transportního proteinu je ovlivňována některými jednonukleotidovými polymorfismy, kterých bylo identifikováno již více než 50 [135]. Z nich tři, lokalizované v exonech 12, 21 a 26 *ABCB1/MDR1* genu a nacházející se v genové vazbě, představují kandidátní polymorfismy z hlediska možného vlivu na biologickou dostupnost kalcineurinových inhibitorů [70, 136-138]. Funkční efekt jednotlivých alel není v dostupné literatuře zcela jednoznačně definován, což zřejmě souvisí s přítomností vazebné nerovnováhy mezi jednotlivými lokusy, a tedy nutností aplikace haplotypové analýzy, která v tomto kontextu přináší komplexnější informaci než pouze analýza vlivu jednotlivých polymorfismů [139, 140]. Jednonukleotidový polymorfismus v exonu 12 *ABCB1/MDR1* genu (1236C>T) sám o sobě neovlivňuje biologickou dostupnost takrolimu, nicméně je-li zkoumána asociace tohoto polymorfismu s dalšími dvěma kandidátními polymorfismy *ABCB1/MDR1* genu, které jsou s ním v genové vazbě, s pomocí haplotypové analýzy, lze detekovat vliv na parametry biologické dostupnosti (poměr C/D) takrolimu [141]. Jiné studie demonstrovaly nevelký, ale statisticky významný vliv i samostatného polymorfismu v exonu

12 na farmakokinetiku kalcineurinových inhibitorů [133, 141]. Nesynonymní polymorfismus lokalizovaný v exonu 21 (2677G>T/A) vedoucí k aminokyselinové záměně (T- ala893ser a A- ala893thr) ve výsledném proteinu a synonymní polymorfismus v exonu 26 (3435C>T) představují jednu z nejvíce studovaných oblastí *ABCB1/MDR1* genu. Genotyp *ABCB1/MDR1* 2677TT (Ser893) byl na základě in vitro studií identifikován jako indikátor intenzivnějšího transportu xenobiotik z intracelulárního do extracelulárního prostoru [142]. Naproti tomu lze nalézt údaje, které asociují *MDR1* 2677TT genotyp a *MDR1* 1236T- 3436T- 2677T haplotyp, s nízkou mírou exprese, respektive aktivity P-glykoproteinu, a tedy s vyšší mírou absorpce kalcineurinových inhibitorů [114, 143, 144]. Jiná data ukazují, že *ABCB1/MDR1* 3435CC genotyp je asociován s větší plochou pod křivkou (AUC) plazmatické koncentrace cyklosporinu A, a že *ABCB1/MDR1* 3435C- 2677G haplotyp je významným prediktorem expozice cyklosporinu A [145, 146]. Genotyp *ABCB1/MDR1* 3435TT byl v případě přítomnosti u dárce transplantované ledviny asociován s rozvojem známek nefrotoxicity cyklosporinu A po transplantaci ledviny [147].

Obecně lze říci, že polymorfismy *ABCB1/MDR1* +1236C>T, +2677G >T>A a +3435C>T lokalizované ve výše zmíněných exonech genu mění konformaci a modifikují funkci P-glykoproteinu změnou jeho substrátové specifity, což vede ke snížení aktivity transportéru [148, 149].

## 6.2. mTOR inhibitory

V případě mTOR inhibitorů existuje evidence o asociaci biologické dostupnosti s polymorfismy genů *CYP3A4* a *CYP3A5* [80, 150], avšak ani zde nejsou výsledky publikovaných prací zcela jednoznačné [151]. Doposud nebylo alelickými asociačními studiemi, provedenými formou analýzy jednotlivých polymorfních lokusů, jednoznačně prokázáno, že variabilitu farmakokinetických parametrů mTOR inhibitorů ovlivňují polymorfismy *ABCB1/MDR1* genu [80, 151].

Metodou haplotypové analýzy byla nalezena asociace některých *CYP3A4-CYP3A5* haplotypů s biologickou dostupností mTOR inhibitorů, avšak ani tento přístup neprokázal vliv *ABCB1/MDR1* polymorfismů, respektive haplotypů [152].

## 7. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ ALELICKÝCH ASOCIAČNÍCH STUDIÍ

Role výše zmíněných polymorfismů ve vztahu k variabilitě farmakokinetických parametrů kalcineurinových inhibitorů byla intenzivně studována a mnohými autory byla nalezena souvislost s biologickou dostupností i s rychlostí dosažení cílových hladin [65, 124, 127, 130, 133, 143, 153]. Byla prokázána i souvislost těchto polymorfismů s rizikem vzniku akutní celulární rejekce po transplantaci srdce a jater [154, 155]. Tato data by mohla být použita při identifikaci pacientů ve vyšším riziku nedosažení adekvátních hladin imunosupresiv a tedy ve vyšším riziku vzniku akutní celulární rejekce i po transplantaci ledviny. Tito jedinci by mohli na základě apriorní znalosti příslušného genotypu či haplotypu profitovat z adekvátní úpravy iniciační dávky imunosuprese.

V dostupných publikacích vztahujících se k tomuto tématu však stále panuje značná kontroverze v dosažených výsledcích. Zvláště v případě studií, které se zabývaly asociací *ABCB1/MDR1* genotypů a farmakokinetických parametrů, respektive vzniku akutní rejekce [132, 144, 146, 154-157]. Dosažení těchto mnohdy protichůdných výsledků pravděpodobně vyplývá z nedodržení některých konsensuálních pravidel, která regulují způsob přípravy a provedení kvalitní alelické asociační studie [158]. Mondry et al. v této souvislosti zavedl primární a sekundární kritéria kvality, která je nezbytné splnit, aby mohly být výsledky příslušné alelické asociační studie považovány za validní [159]. Mezi primární kritéria zde byla zařazena podmínka biologické relevance, neboli zasazení zkoumané asociace do smysluplného patofyziologického rámce, dále adekvátní rozsah studovaného souboru a provedení multivariantní analýzy. Sekundárními kritérii byla existence in vitro studie, která prokazuje funkční dopad zkoumaného polymorfismu, dále přítomnost kontrolní skupiny a v neposlední řadě hodnocení vlivu populační stratifikace. Je nepochybné, že v případě mnohých studií nebyl splněn požadavek dostatečného rozsahu zkoumaného souboru, což vedlo k

neadekvátnímu snížení statistické síly a pouze v několika případech byla provedena haplotypová analýza.

Předkládaná práce hodnotí metodou haplotypové analýzy vliv genových polymorfismů zasazených do relevantního patofyziologického rámce na laboratorní a klinická data u dostatečně velké kohorty pacientů s adekvátní statistickou silou prováděných analýz ( $1-\beta > 80\%$ ).

## 8. CÍL STUDIE- HYPOTÉZA

Cílem provedených analýz bylo prokázat vliv jednonukleotidových polymorfismů, respektive haplotypů genových lokusů *CYP3A4* -288A>G, *CYP3A5* +6986G>A, *ABCB1* +1236C>T, *ABCB1* +2677G>T>A, *ABCB1* +3435C>T na biologickou dostupnost kalcineurinových inhibitorů a mTOR inhibitorů a dále vliv variability farmakokinetických parametrů na riziko vzniku akutní celulární rejekce, respektive přežití štěpu a pacientů po transplantaci ledviny v podmínkách retrospektivní, alelické asociační studie případů a kontrol. Statistické analýzy byly aplikovány na data charakterizující jednotlivé polymorfní lokusy ve vybraných kandidátních genech i na data vyplývající z výsledků provedené haplotypové analýzy *CYP3A* a *ABCB1/MDR1* genů s cílem zhodnocení daných genových variant jako potencionálních genomických biomarkerů některých klinických parametrů transplantace ledviny.

Dále byly za účelem korelace s histologickým nálezem ve tkáni transplantované ledviny zkoumány vybrané jednonukleotidové polymorfismy genu *AGER*.

## 9. STUDIE

### 9.1. Asociace *CYP3A* a *ABCB1/MDR1* haplotypů u pacientů po transplantaci ledviny užívajících kalcineurinové inhibitory

#### 9.1.1. Metody

##### 9.1.1.1. Soubor pacientů

Do studie bylo zařazeno 832 pacientů kavkazského etnika, kteří v letech 1998- 2006 podstoupili transplantaci ledviny v Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze. Imunosupresivní protokol byl založen na podávání cyklosporinu A u 407 pacientů anebo takrolimu u 425 pacientů. K těmto dvěma základním komponentám byl podáván azathioprin nebo mykofenolát mofetil a prednison. U příjemců transplantované ledviny ve vyšším imunologickém riziku (panel reactive antibody- PRA> 50%), nebo u těch kteří podstupovali opakovanou transplantaci, byla aplikována indukční imunosuprese s použitím polyklonální protilátky muromonab-OKT3 nebo antithymocytárního globulinu. Akutní celulární rejekce byly vždy biopsicky verifikovány a klasifikovány podle kritérií Banff 97 [160]. Hraniční změny byly hodnoceny jako akutní celulární rejekce. Klinická a laboratorní data byla hodnocena v 1. a 2. týdnu po transplantaci a dále pak v 1., 3., 6. a 12 měsíci. U všech pacientů byly k dispozici údaje o základní diagnóze- příčině chronického renálního selhání, počtu neshod v HLA (hlavní histokompatibilitní komplex) antigenech- A, -B, -DR, PRA, o délce trvání studené ischémie štěpu, úvodní dávce prednisonu, imunosupresivním režimu, konkomitantní farmakoterapií potencionálně interagující s imunosupresí, věku dárce i příjemce transplantované ledviny, přítomnosti opožděného rozvoje funkce štěpu (delayed graft function- DGF) a dále počet a tíže akutních celulárních rejekcí. Pro potřeby analýzy přežití štěpů a pacientů byla k dispozici kompletní data o délce sledování i přežití štěpů i pacientů.

Cyklosporin A a takrolimus byly podávány v podobě Sandimmun Neoral (Novartis, Praha, Česká republika), respektive Prograf (Astellas, Praha, Česká republika). Úvodní dávka byla v případě cyklosporinu A 8mg/kg, v případě takrolimu 0,2mg/kg a mykofenolát mofetilu 1000mg podávaná dvakrát denně. V den transplantace a první pooperační den bylo podáno 500mg methylprednisonu, na které navázala terapie prednisonem v iniciační dávce 20mg denně s postupným snižováním dávky až na 5mg denně na konci třetího měsíce po transplantaci.

#### 9.1.1.2. Stanovení hladiny léků

Hladiny léčiv byly stanovovány jako tzv. údolní hladiny ( $C_0$ ) ve vzorcích plné krve odebrané pacientům před požitím ranní dávky s použitím technologie EMIT (enzyme-multiplied immunoassay technique). Cílové hladiny cyklosporinu A byly 200-300ng/ml v prvním měsíci po transplantaci, 150-250ng/ml ve druhém a třetím měsíci a následně 100-150ng/ml. Cílové hladiny takrolimu byly ve stejných časových obdobích 10-15ng/ml, 5-15ng/ml a 5-10ng/ml.

#### 9.1.1.3. Detekce jednonukleotidových polymorfismů

DNA byla izolována manuálně z plné krve za pomoci DNA Purification Kit (Fermentas, Vilnius, Litva). Jednonukleotidové polymorfismy *CYP3A4* -288A>G, *CYP3A5* +6986G>A, *ABCB1* +1236C>T, *ABCB1* +2677G>T>A, *ABCB1* +3435C>T byly stanoveny polymerázovou řetězovou reakcí (polymerase chain reaction- PCR) následovanou analýzou polymorfismu délky restrikčních fragmentů (restriction fragment length polymorphisms-RFLP), které byly pro tyto polymorfismy již zavedeny [117, 138, 156, 161]. Za účelem minimalizace vzniku chyb byly ke každé prováděné PCR přidány pozitivní i negativní kontroly a analýzy byly prováděny třemi pracovníky Transplantační laboratoře PEM IKEM. V případě neshody ve výsledcích analýzy mezi jednotlivými pracovníky byla tato opakována. Po provedení testování platnosti Hardy-Weinbergova ekvilibria byly získané alelické



frekvence porovnávány s údaji z populačního registru Utah residents with a Northern and Western ancestry (CEU) z databáze HapMap [162]

#### 9.1.1.4. Statistická analýza.

Nejprve byl pomocí počítačového programu DSTPLAN (<http://linkage.rockefeller.edu/soft>) kalkulován rozsah zkoumaného souboru, který by byl dostatečný k detekci asociace haplotypu a biologické dostupnosti léčiva definované jako C/D/kg. V případě haplotypu [*CYP3A4* -288A; *CYP3A5* +6986G], který reprezentuje 80% všech *CYP3A* haplotypů, bylo za účelem detekce rozdílu alespoň 12,5% v parametru C/D/kg nutno analyzovat data 329 nositelů tohoto haplotypu a 66 probandů, u kterých daný haplotyp přítomen nebyl. Za předpokladu výskytu haplotypů [*ABCB1* +1236C; +2677G; +3435C] a [*ABCB1* +1236T; +2677T; +3435T] ve sledované populaci v poměru 1:1 by muselo být v každé skupině 406 jedinců, aby bylo možno detekovat rozdíl 6,5% v parametru C/D/kg. Rozsah studovaného souboru umožnil s ohledem na 30% prevalenci akutní celulární rejekce detekovat asociaci s odds ratio (OR) větším nebo rovným 2,3 (*CYP3A4* -288A>G, frekvence 0,043) a s OR větším nebo rovným 1,4 (*ABCB1* +1236C>T, frekvence 0,477). Všechny statistické výpočty byly prováděny na 5% hladině významnosti, statistická síla testů haplotypové analýzy byla 80%.

Pro srovnávání spojitých veličin byly adekvátně použity testy ANOVA, Mann-Whitney nebo Kruskal-Wallis a pro srovnávání proporcí, respektive kategoriálních veličin byly použity chí-kvadrát test a Fischerův exaktní test. Hardy-Weinbergovo ekvilibrium bylo testováno pomocí Fischerova exaktního testu, který byl součástí počítačového programu Arlequin [163]. Asociace jednotlivých polymorfismů (single locus analýza) byla provedena pomocí testu trendu dle Armitage (1 *df*). Frekvence *CYP* a *ABCB1* haplotypů byly stanoveny pomocí Expectation-Maximization (EM) algoritmu, který umožňuje odhad přítomnosti právě určitého haplotypu u nepříbuzných jedinců, tedy v situaci kdy nejsou známy údaje o segregaci

jednotlivých alel v rámci rodiny [164]. Síla vazebné nerovnováhy mezi jednotlivými genovými lokusy byla vyjádřena jako koeficient vazebné nerovnováhy  $r^2$ , který nabýval hodnot od 0 do 1. Hodnota  $r^2$  rovnající se 1 je indikátorem významné vazebné nerovnováhy.

Testování přítomnosti asociace mezi *CYP* a *ABCB1* haplotypy a akutní rejeckí bylo provedeno pomocí globálního testu diferenciacce založeného na principu modelování s použitím Markovova řetězce [163]. V případě tohoto testu je celková hodnota signifikace  $P$  pro distribuci jednotlivých haplotypů vždy již implicitně adjustována na počet testovaných haplotypů, a proto nebyla prováděna korekce na mnohočetné testování.

Za účelem testování haplotypů a dalších relevantních klinických proměnných ve vztahu k jejich potencionálnímu ovlivnění výskytu akutní rejeckce, délky přežití štěpů a pacientů, byla použita metoda lineární a logistické regrese. Hodnoty predikované pravděpodobnosti výskytu akutní rejeckce kalkulované jednotlivými regresními modely byly použity ke konstrukci ROC křivky (receiver operating characteristic curves- ROC). Metody testující přesnost provedených regresních analýz (goodness-of-fit statistika, test kolinearity) byly provedeny pro každý navržený regresní model.

Hladina významnosti byla stanovena jako  $P$  menší než 0,05. Všechny hodnoty  $P$  byly kalkulovány jako oboustranné (two-sided). Vazebná analýza zkoumaných genových lokusů byla provedena s použitím počítačového programu Arlequin [163]. Ostatní statistické výpočty byly provedeny pomocí aplikace SPSS 14 (SPSS Inc., Chicago, IL).

### 9.1.2. Výsledky

#### 9.1.2.1. Charakteristika souboru pacientů

Střední věk pacientů, kteří podstoupili transplantaci ledviny byl 51 let (rozmezí 17-79 let), ve zkoumaném souboru převažovali muži ( $N=543$ ; 65,3%). Průměrný počet neshod v HLA antigenech mezi příjemcem a dárce transplantované ledviny (lokusy A, B, DR) byl  $3,0 \pm 1,2$  a průměrná hodnota panel reaktivních protilátek (PRA) byla  $21,4 \pm 29,2$ . Střední věk dárců transplantovaného orgánu činil 48 let (rozmezí 2-76 let). V prvním roce po transplantaci byla akutní celulární rejekce biopticky verifikována u 267 (32,1%) pacientů. Jednoroční přežití štěpů u pacientů léčených takrolimem bylo 92,7%, respektive 91,9% u pacientů s imunosupresí založenou na cyklosporinu A. Pacienti léčení takrolimem byli v porovnání se skupinou léčenou cyklosporinem A v době transplantace statisticky významně mladší, byla u nich častější transplantace ledviny od žijícího dárce, měli kratší dobu sledování, nižší kumulativní dávku prednisonu a vyšší počet neshod v lokusu HLA-DR (Tabulka 1.1). Kromě výše uvedených nebyly mezi oběma skupinami pacientů nalezeny žádné další statisticky významné rozdíly.

#### 9.1.2.2. Genové polymorfismy

##### 9.1.2.2.1. Analýza jednotlivých genových lokusů

Všechny alely ve zkoumaných genových lokusech byly v Hardy-Weinbergově rovnováze. Asociační analýza jednotlivých lokusů a výskytu akutní rejekce neprokázala přítomnost asociace mezi těmito parametry. Rovněž nebyl přítomen statisticky významný rozdíl ve frekvenci jednotlivých genotypů mezi pacienty s bioptickým průkazem hraničních změn ve štěpu a akutní rejekce (Tabulka 1.2).

##### 9.1.2.2.2. Haplotypová analýza

Mezi zkoumanými polymorfismy v rámci *CP3A4-CYP3A5* lokusu ( $P < 0,001$ ,  $r^2 = 0,31$ ), respektive *ABCB1* genu ( $P < 0,001$ ,  $r^2 = 0,41$ ) byla prokázána střední vazebná nerovnováha.

Vazebná nerovnováha mezi *CYP3A4-CYP3A5* a *ABCB1* lokusy byla statisticky signifikantní, nicméně velmi slabá ( $P < 0,001$ ,  $r^2 = 0,01$ ). U pacientů s prokázanou akutní rejekcí byla přítomna silnější vazebná nerovnováha v rámci *CYP3A* lokusu a slabší vazebná nerovnováha mezi jednotlivými alelami konstituujícími *ABCB1* lokus než v případě kontrol (Obrázek 1.1).

V souladu s tímto pozorováním bylo prokázáno i v podmínkách haplotypové analýzy zaměřené na všech pět zkoumaných *CYP3A-ABCB1* lokusů, že je přítomen významný rozdíl v distribuci příslušných haplotypů mezi pacienty s akutní rejekcí a kontrolami (global  $P = 0,02$ ). Haplotypová analýza zaměřená pouze na *CYP3A* polymorfismy neprokázala rozdíl v distribuci haplotypů mezi oběma zkoumanými soubory pacientů ( $P = 0,17$ ). V případě analýzy analogicky provedené na *ABCB1* haplotypech byl nalezen významný rozdíl v jejich distribuci mezi pacienty s rejekcí transplantované ledviny a kontrolami ( $P = 0,003$ ).

Významný rozdíl v distribuci *ABCB1* haplotypů mezi oběma skupinami pacientů naznačuje, že některý z haplotypů tohoto genu může mít souvislost s rizikem vzniku akutní rejekce.

Další analýzy byly zaměřeny na identifikaci konkrétního kauzálního haplotypu. Byl identifikován rizikový haplotyp [*ABCB1* +1236C; +2677G; +3435T], který zvyšoval pravděpodobnost výskytu akutní rejekce 1,4 krát ( $P = 0,038$ ), a který se zároveň významně podílel na statisticky významném dosažení v testu vazebné nerovnováhy (Tabulka 1.3). S akutní rejekcí byl asociován ještě minoritní haplotyp [*ABCB1* +1236C; +2677A; +3435T], který však byl přítomen pouze u přibližně 2% pacientů.

U dvou nejčastěji se vyskytujících *ABCB1* haplotypů (T-T-T) a (C-G-C), které se skládaly buď pouze z polymorfních nebo naopak tzv. divokých (wild-type) alel, nebyla nalezena asociace s rizikem akutní rejekce. Naproti tomu u haplotypu *ABCB1* (C-G-T), který zvyšoval riziko akutní rejekce transplantované ledviny, byly přítomny dvě divoké alely *ABCB1* +1236C a +2677G a jedna alela polymorfní *ABCB1* +3435T (Tabulka 1.3). Nalezená asociace *ABCB1* haplotypu C-G-T s rizikem vzniku akutní rejekce byla konzistentní s

nálezem slabší vazebné nerovnováhy v rámci *ABCB1* lokusu u pacientů s akutní rejekcí než u pacientů, u kterých odhojování přítomno nebylo (Obrázek 1.1). Slabší vazebná nerovnováha mezi příslušnými polymorfními lokusy představuje situaci, kdy s vyšší pravděpodobností dochází k rekombinaci a tím ke zvýšení frekvence výskytu kombinace genotypů s alelami v *trans*-fázi.

U pacientů s haplotypem [*CYP3A* -288A; *CYP3A5* +6986G] bylo dosaženo cílových hladin takrolimu dříve a byla u nich také vyšší biologická dostupnost tohoto léčiva (C/D/kg) v 1. týdnu po transplantaci než u těch, kteří byli nositeli jiných *CYP3A* haplotypů ( $2,5 \pm 1,3$  vs.  $3,8 \pm 2,8$  dne,  $P < 0,001$ ; respektive  $103,3 \pm 58,6$  vs.  $56,7 \pm 20,9$  (ng/ml)/(mg/kg),  $P < 0,001$ ). Vzhledem k přítomnosti střední vazebné nerovnováhy mezi *CYP3A4* a *CYP3A5* lokusy, se hodnoty výše uvedených parametrů, zjištěné při analýze obou těchto genů zvlášť, statisticky významně nelišily ( $2,6 \pm 1,5$  dne a  $101,0 \pm 58,2$  (ng/ml)/(mg/kg) pro *CYP3A4* -288A homozygoty, respektive  $2,5 \pm 1,3$  dne a  $103,1 \pm 58,5$  (ng/ml)/(mg/kg) pro *CYP3A5* +6986G homozygoty).

Polymorfismy *CYP3A4* a *CYP3A5* lokusů neměly vliv na farmakokinetiku cyklosporinu A. Podobně haplotypy *ABCB1* lokusu neovlivňovaly v podmínkách naší studie žádný ze sledovaných farmakokinetických parametrů cyklosporinu A (Obrázek 1.2).

#### 9.1.2.3. Faktory ovlivňující vznik akutní rejekce a přežití štěpu

Logistickou regresní analýzou bylo prokázáno, že nezávislými prediktory výskytu akutní rejekce štěpu po transplantaci ledviny jsou počet neshod v HLA-DR antigenu, opožděný rozvoj funkce štěpu, věkem pacienta v době transplantace a také *ABCB1* haplotypy. Navzdory statistické signifikaci byl však kalkulovaný relativní příspěvek *ABCB1* haplotypů v rámci konstruovaného predikčního modelu malý. Po jejich vyřazení z analýzy se plocha pod ROC (receiver operating characteristic curve) křivkou pro diagnózu akutní rejekce zmenšila pouze o 1% (Obrázek 3).

Multivariantní analýza definovala jako nezávislé rizikové faktory selhání funkce štěpu věk dárce, věk příjemce v době transplantace, délku trvání studené ischemie transplantované ledviny a anamnézu výskytu tří a více akutních rejekcí (Tabulka 4). Ani *CYP3A*, ani *ABCB1* haplotypy neměly vliv na délku přežití štěpu.

### 9.1.3. Diskuse

Současné znalosti, které se týkají asociace *CYP3A4* -288A>G, *CYP3A5* +6986G>A, *ABCB1* +1236C>T, *ABCB1* +2677G>T>A a *ABCB1* +3435C>T polymorfismů a biologické dostupnosti takrolimu a cyklosporinu A u pacientů po transplantaci ledviny, naznačují jejich vliv na metabolismus a distribuci (absorpci/transport) těchto léčiv (17, 62, 63, 70, 72, 74, 77). Zmíněné kandidátní geny, respektive jejich polymorfismy, s funkční relevancí potvrzenou in vitro studiemi, byly vzhledem k přítomnosti vazebné nerovnováhy mezi jejich jednotlivými lokusy, zkoumány metodou haplotypové analýzy.

Bylo prokázáno, že haplotypová struktura *ABCB1* genu, neboli uspořádání alel na jednom chromosomu, modifikuje riziko akutní rejekce po transplantaci ledviny. Tento náález stojí v protikladu k negativním výsledkům asociační analýzy zaměřené na jednotlivé genové lokusy provedené v této i v jiných dostupných studiích (13, 56, 68). Tato diskrepance poukazuje na fakt, že haplotypová analýza tím, že hodnotí vliv více genových lokusů najednou, poskytuje vyšší informační hodnotu, než analýza jednotlivých polymorfismů. V případě analýzy jednotlivých lokusů a komplexních fenotypů nemusí být příslušná asociace v některých případech dokonce vůbec detekována [165].

Nejpřesnějším způsobem identifikace alel asociovaných s příslušným onemocněním by bylo testování všech známých polymorfismů přítomných v daném kandidátním genu, respektive určité jeho oblasti. Tento přístup by však byl neefektivní, protože polymorfní alela vždy poskytuje také informaci o polymorfismech přítomných ve svém okolí, se kterými je v genové vazbě, a tedy ve vazebné nerovnováze, a spíše než jako kauzální činitel vystupuje mnohdy jako indikátor přítomnosti určitého polymorfismu [166]. Alternativou k výše zmíněnému přístupu je vymezení části genu, ve které se uplatňuje vliv polymorfismu asociovaného s onemocněním, a která je definována určitou mírou vazebné nerovnováhy v příslušné oblasti genu. Nezbytným předpokladem k aplikaci tohoto přístupu, který se

vyznačuje vysokou sensitivitou pro detekci přítomnosti kauzálního lokusu ve zkoumané oblasti genu, je však rekonstrukce haplotypů založená na odhadu pomocí výpočetního algoritmu [164]. Rekonstrukce haplotypů bez tohoto přístupu je možná pouze u jedinců homozygotních pro všechny sledované lokusy. Takto však není možné identifikovat alelickou fázi u jedinců heterozygotních ve více než jednom lokusu. Tito jedinci musí být tedy ve výsledku ze studie vyřazeni, což redukuje rozsah zkoumaného souboru, a tedy snižuje statistickou sílu prováděné analýzy. S podobným problémem se potýkala řada autorů publikujících negativní závěry svých studií [133, 134, 141, 144, 146]. Uplatnění mnoha genových polymorfismů na výsledném fenotypu může mimo jiné záviset i na jejich lokalizaci na maternálním, respektive paternálním chromosomu (*cis*- a *trans*- fáze). Více polymorfismů v příslušné fázi může mít větší vliv na fenotyp, protože jejich společné působení může mít větší vliv na funkci proteinu, než by měla například jen záměna jedné aminokyseliny (88, 89).

Kromě této studie, která prokázala vztah akutní rejekce k haplotypu polymorfních alel, existují i jiné práce, které prokázaly vztah jednotlivých polymorfismů k výsledkům transplantace solidních orgánů (13, 70-72, 82). Žádná z těchto prací však v použitých statistických analýzách nedosahuje požadované hodnoty statistické síly 80%. Z tohoto faktu vyplývají dva potencionální problémy. Jednak je vyšší pravděpodobnost, že není detekován přítomný rozdíl jako statisticky signifikantní a není tak odhalen skutečně přítomný efekt daného polymorfismu či haplotypu, což je důsledek nárůstu pravděpodobnosti chyby II. druhu, tedy falešné negativy. Druhým problémem je nárůst podílu falešně pozitivních výsledků, který je úměrný poklesu statistické síly daného testu [167].

Statistická signifikace ovšem ne vždy znamená biologickou relevanci. Na základě zde provedené multivariátní analýzy se ukazuje, že ze všech statisticky významných nezávislých rizikových faktorů vzniku akutní rejekce je příslušný *ABCB1* haplotyp tím nejmeně významným. Tento závěr je konzistentní s tím, že hlavními determinantami výsledků



transplantace ledviny jsou významné klinické proměnné, se kterými nejsou, pokud jde o sílu predikce, *ABCB1* haplotypy srovnatelné. Zvýšení rizika akutní rejekce příslušným *ABCB1* haplotypem 1,4 krát odpovídá i jiným pozorováním. Například Ioannidis et al. prokázal, že efekt polymorfismů/haplotypů na vznik komplexních fenotypů je obecně nízký, a že se zde většina hodnot odds ratio (OR) nalézá v rozmezí 1,3-1,7 [168]. Lze tedy jen stěží říci, že by genetické determinanty představovaly kauzální faktor. Spíše se jedná o faktor modifikující genotyp, který v klinické praxi, kde hlavními determinantami jsou právě silné klinické proměnné, sám o sobě pravděpodobně nemůže sloužit jako biomarker rejekce či přežití štěpů. Další limitací tohoto přístupu je problém stanovení haplotypů u nepříbuzných jedinců. V této situaci je nezbytné použití matematického modelování, které rekonstruuje příslušný haplotyp s určitou mírou pravděpodobnosti, a ve výsledku nemůže být aplikován na konkrétního pacienta, protože není známa fáze, ve které se alely nacházejí.

Bylo prokázáno, že rychlé dosažení cílových hladin imunosuprese časně po transplantaci ledviny je jedním z významných faktorů ovlivňujících vznik akutní rejekce (93, 94). Navzdory průkazu, že *CYP3A* haplotypy významně ovlivňují farmakokinetické parametry takrolimu, nebyla nalezena jejich asociace s rizikem odhojování transplantované ledviny. Tuto diskrepanci lze vysvětlit častým monitorováním hladin léčiva a adekvátní úpravou dávkování. V podmínkách této práce bylo možno prokázat pouze souvislost *CYP3A4-CYP3A5* haplotypu s farmakokinetickými parametry takrolimu. Tento fakt by mohl být argumentem pro stanovení genotypu pro *CYP3A4* nebo *CYP3A5* lokus s cílem individualizace dávkování takrolimu. Vzhledem k tomu, že jsou oba geny, respektive polymorfismy v genetické vazbě byla by postačující informací znalost pouze jednoho z nich.

Pozorování, že *ABCB1* haplotypy neovlivňují přímo farmakokinetické parametry kalcineurinových inhibitorů, ale představují rizikový faktor rejekce naznačují zřejmou souvislost s aktivitou P-glykoproteinu a biologickou dostupností imunosupresiv v rámci

kompartimentu plazma- imunokompetentní buňka. U pacientů s *ABCB1* haplotypem, který přispívá k vyšší aktivitě P-glykoproteinu, může být koncentrace léčiva v intracelulárním prostoru nižší, navzdory dosažení cílové plazmatické hladiny měřené jako hladina údoľní. Bylo prokázáno, že maximální míry inhibice kalcineurinu je v případě cyklosporinu A dosaženo dvě dodiny po podání léčiva (70-96% v 1. a 2. hodině po podání léku) [169]. Nelze také předpokládat jednoduchý lineární vztah mezi naměřenými hladinami imunosupresiv a celkovou expozicí organismu těmto léčivům, ani míry působení na cílové buněčné struktury, což vedlo ke vzniku konceptu farmakodynamického monitorování účinnosti imunosuprese prostřednictvím měření exprese NFAT asociovaných genů [170]. Tímto způsobem mohou příslušné haplotypy působit jako modifikátory rizika vzniku rejekce transplantovaného orgánu, aniž by ovlivňovaly měřitelné farmakokinetické parametry léčiva. Z dostupných dat je zřejmé, že *ABCB1* haplotypy ovlivňují aktivitu P-glykoproteinu silněji než jednotlivé polymorfismy.

## 9.2. Asociace CYP3A a ABCB1/MDR1 haplotypů u pacientů po transplantaci ledviny užívajících mTOR inhibitory

### 9.2.1. Metody

#### 9.2.1.1. Soubor pacientů

Do studie bylo zařazeno 184 pacientů kavkazského etnika, u kterých byla provedena transplantace ledviny v Institutu klinické a experimentální medicíny v letech 1998- 2006, a kterým byla jako udržovací imunosuprese podán buď sirolimus (Rapamune, Wyeth, Velká británie) nebo everolimus (Certican, Novartis, Praha, Česká republika) v kombinaci s mykofenolát mofetilem (CellCept, Roche, Velká británie) a steroidy, případně v kombinaci s kalcineurinovými inhibitory cyklosporinem A (Novartis, Praha, Česká republika) nebo takrolimem (Astellas, Praha, Česká republika). Klinické údaje a laboratorní data byla registrována v 1. a 2. týdnu po transplantaci a dále pak v 1., 3. a 6. měsíci po zahájení terapie mTOR inhibitory. U všech pacientů byla známa příčina chronického renálního selhání, počet neshod v HLA lokusech mezi dárce a příjemcem, frekvence panel reaktivních protilátek, doba studené ischemie, úvodní dávka prednisonu, konkomitantní farmakoterapie s potenciálem k interakcím s imunosupresivy, věk dárce a incidence akutní rejekce transplantované ledviny (Tabulka 2.1).

Úvodní dávky kalcineurinových inhibitorů, byly-li v imunosupresivním protokolu zastoupeny, činily 8 mg/kg u cyklosporinu A a 0,2 mg/kg u takrolimu. Zkoumaná kohorta pacientů byla rozdělena do tří skupin podle způsobu, jakým byl do léčby zaveden mTOR inhibitor. V první skupině o rozsahu 50 pacientů, byli zařazeni nemocní, kteří byli léčeni *de novo* sirolimem v kombinaci s cyklosporinem A (n=14), s takrolimem (n=23) nebo mykofenolát mofetilem (n=13). Druhou skupinu tvořili pacienti léčeni *de novo* everolimem v kombinaci pouze s CyA (n=8), Tac a prednisonem (n=2), nebo CyA a prednisonem (n=22), o celkovém rozsahu 32 probandů. Třetí skupinu představovalo 102 pacientů původně

léčených imunosupresivním režimem založeným na kalcineurinovém inhibitoru s následnou konverzí na sirolimus pro anamnézu malignity, toxicity kalcineurinového inhibitoru případně pro pokročilou dysfunkci štěpu (Tabulka 2.2).

#### 9.2.1.2. Stanovení hladiny léků

Hladiny sirolimu a everolimu byly stanovovány v certifikované biochemické laboratoři jako údolní hladiny léčiv ve vzorcích plné krve s použitím metody MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay) (IMX, Abbot, Česká republika). Hladiny kalcineurinových inhibitorů (cyklosporinu A a takrolimu) byly stanovovány způsobem uvedeným v oddíle 8.1.1.2.

#### 9.2.1.3. Definice sledovaných laboratorních parametrů

Anémie byla definována na základě kritérií WHO jako hemoglobinemie nižší než 130 g/l u mužů, respektive 120 g/l u žen [171], nebo přítomnost terapie erytropoetinem. Hypercholesterolemie byla definována jako hladina sérového cholesterolu vyšší než 6 mmol/l, hypertriacylglycerolemie jako hodnota sérových triacylglycerolů vyšší než 2 mmol/l. Proteinurie byla taxativně rozdělena na dvě pásma dle závažnosti, jako mírná- v rozmezí hodnot 0,5- 1,49 g/24 hod, a významná- více než 1,5 g/24 hod.

#### 9.2.1.4. Detekce jednonukleotidových polymorfismů

Metodika stanovení jednotlivých polymorfismů byla stejná jako v případě studie s kalcineurinovými inhibitory- DNA byla izolována z plné krve s použitím DNA Purification Kit (Fermentas, Vilnius, Litva), jednonukleotidové polymorfismy *CYP3A4* -288A>G, *CYP3A5* +6986G>A, *ABCB1* +1236C>T, *ABCB1* +2677G>T>A, *ABCB1* +3435C>T byly detekovány metodou PCR/RFLP, jak byla popsána v dostupné literatuře [117, 138, 156, 161]. Stejná opatření byla využita i k minimalizaci genotypizační chyby- ke každému reakčnímu cyklu byla přidána pozitivní i negativní kontrola a stanovení byla opakována, byla-li shoda mezi jednotlivými pracovníky provádějícími analýzy (P.H, E.N., K.H.) menší než 90%.

Alelické frekvence byly testovány na přítomnost Hardy-Weinbergova ekvilibria a následně byly porovnány s údaji v databázi Hap Map (populace Northern and Western European ancestry (CEU)) za účelem ověření nepřítomnosti populační stratifikace [162].

#### 9.2.1.5 Statistická analýza

Adekvátní statistické testy byly použity k porovnání spojitých veličin (ANOVA, Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis test), respektive k porovnání diskretních kategorií a poměrů ( $\chi^2$  test, Fisherův exact test). Přítomnost Hardy-Weinbergova ekvilibria v případě distribuce jednotlivých genotypů byla testována s použitím  $\chi^2$  testu.

K testování přítomnosti vazebné nerovnováhy mezi *CYP3A* a *ABCB1* lokusy a dále k testování asociace *CYP3A* haplotypů a anémie, hypercholesterolemie a proteinurie byl použit globální test diferenciací založený na Markovově odhadové metodě [163], respektive EM (Expectation-Maximization) algoritmu [164].

Rozsah zkoumaného souboru (184 pacientů) umožnil detekovat asociaci *CYP3A* genotypu/haplotypu a vedlejších účinků terapie mTOR inhibitory za předpokladu jejich alespoň 33% prevalence a odds ratio (OR) většího nebo rovného 3,4. Zároveň bylo možno detekovat nejméně 40% rozdíl v biologické dostupnosti (C/D/kg), respektive v hladině léku (ng/ml), které byly determinovány *CYP3A4* -228A>G (frekvence 92%) a *CYP3A5* +6986G>A (frekvence 85%) polymorfismy. Výpočty statistické síly jednotlivých analýz byly provedeny prostřednictvím počítačové aplikace DSTPLAN (<http://linkage.rockefeller.edu/soft>) na 5% hladině statistické významnosti.

Sledované polymorfismy byly testovány jako nezávislé prediktory vedlejších účinků terapie mTOR inhibitorů s použitím multivariátní analýzy. Jako statisticky signifikantní byly označeny výsledky analýz s pravděpodobností chyby I. druhu menší než 5% ( $P < 0.05$ ). Hodnoty  $P$  byly kalkulovány jako oboustranné. Statistické analýzy byly provedeny s použitím počítačového programu SPSS verze 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

### 9.2.2. Výsledky

#### 9.2.2.1. Charakteristika souboru pacientů

Střední věk pacientů byl 49 let (rozmezí, 18-71 let), 129 pacientů (71,3%) byli muži. Střední věk dárců byl 47 let (rozmezí, 7-76 let). Střední délka klinického sledování pacientů byla  $60,6 \pm 30,4$  měsíců, akutní celulární rejekce byla diagnostikována u 23 (28%) pacientů léčených *de novo* mTOR inhibitory a u 50 (49%) pacientů po konverzi na sirolimus. Jednoroční přežití štěpů bylo 90,2% u pacientů *de novo* léčených mTOR inhibitory, respektive 96,3% u pacientů po konverzi na mTOR inhibitor. U pacientů léčených mTOR inhibitory *de novo* byla nižší frekvence panel reaktivních protilátek (PRA). Střední doba do konverze na mTOR inhibitor činila 23,6 měsíců (rozmezí, 0,2-108,2 měsíců).

#### 9.2.2.2. Efekt terapie mTOR inhibitory na lipidemii a proteinurii

Vstupní hodnoty cholesterolemie (průměr,  $5,30 \pm 1,26$  vs.  $6,09 \pm 1,40$  mmol/l,  $p < 0.001$ ) a triacylglycerolemie (průměr,  $2,34 \pm 1,13$  vs.  $3,21 \pm 1,76$  mmol/l,  $p < 0.002$ ) byly porovnány s hodnotami těchto parametrů ve 3. měsíci po zahájení imunosupresivní terapie mTOR inhibitory. Podobně významná změna byla zaznamenána i v případě proteinurie, kdy byl v 1. měsíci po zahájení terapie mTOR inhibitory pozorován více než dvojnásobný vzestup proteinurie (průměr,  $0,89 \pm 1,08$  vs.  $1,44 \pm 1,88$  g/d,  $p = 0.003$ ) (Obrázek 2.1). Nebyl zaznamenán významný pokles hemoglobinu ve 3. měsíci ve srovnání se vstupními hodnotami (průměr,  $111,36 \pm 20,08$  g/l vs.  $111,48 \pm 34,53$  g/l, NS). Nebyla nalezena asociace mezi vedlejšími účinky terapie mTOR inhibitory a věkem či pohlavím pacientů, imunologickým rizikem nebo počtem transplantací ani dalšími klinickými parametry, což naznačovalo přítomnost jiného potenciálního ovlivňujícího faktoru.

#### 9.2.2.3. Alelická asociační analýza, analýza CYP3A haplotypů

Všechny studované polymorfismy (*CYP3A4*, *CYP3A5*, *ABCB1/MDR1*) se nacházely v Hardy-Weinbergově rovnováze s následujícími frekvencemi výskytu: *CYP3A4* (-288A>G)

4,1% , *CYP3A5* (6986G>A) 14.2%, respektive *ABCB1/MDR1* exon 12 (1236C>T) 44,3%, exon 21 (2677G>T/A) 43,4% a exon 26 (3435C>T) 53,7%.

Nebyla nalezena asociace mezi vedlejšími účinky terapie mTOR inhibitory s žádným ze studovaných polymorfismů na základě modelu studujícího jednotlivé genové lokusy.

Mezi posuzovanými alelami *CYP3A4-CYP3A5* lokusu bylo detekováno statisticky významné vazebné disekvilibrium (LD) při stratifikaci souboru pacientů podle přítomnosti anémie a hypercholesterolemie ve 3. měsíci a proteinurie v 6. měsíci léčby mTOR inhibitory. U pacientů s těmito vedlejšími účinky léčby byla přítomna statisticky významně slabší vazebná nerovnováha než u kontrolní skupiny pacientů (Tabulka 2.3), což je indikativní pro vyšší pravděpodobnost rekombinace. Haplotypové uspořádání *CYP3A* lokusu tedy bylo asociováno s anemií, hypercholesterolemií a proteinurií.

Za účelem identifikace konkrétních haplotypů, které by se mohly podílet na vzniku sledovaných klinických parametrů, byly analyzovány jednotlivé *CYP3A* haplotypy a byla nalezena signifikantně vyšší frekvence výskytu *CYP3A4-CYP3A5* AAGA haplotypu u pacientů s výskytem nežádoucích účinků. Efekt tohoto haplotypu nebyl zanedbatelný. Přítomnost *CYP3A4-CYP3A5* AAGA haplotypu zvyšovala pravděpodobnost vzniku anémie ve 3. měsíci přibližně desetkrát ( $p=0,006$ , OR=10,57, CI95% 1,33-83,93), vznik proteinurie vyšší než 0,5 g/d zvyšovala pětkrát ( $p=0,008$ , OR=4,87, CI95% 1,48-16,35) a vznik významné proteinurie v 6. měsíci, tedy proteinurie vyšší než 1,5 g/d, zvyšovala téměř sedmkrát ( $p=0,003$ , OR=6,71, CI95% 2,08-21,63). Z těchto dat vyplývá, že haplotypové uspořádání *CYP3A* genů ovlivňovalo rozvoj nežádoucích účinků terapie mTOR inhibitory.

#### 9.2.2.4. Farmakogenetická studie

Biologická dostupnost (C/D/kg) i hladiny mTOR inhibitorů byly signifikantně nižší u pacientů s *CYP3A* genotypem podmiňujícím vyšší expresi cytochromu P450III<sub>A</sub> (*CYP3A4* - 288AG, *CYP3A5* 6986GA), byla-li analýza provedena v rámci celé skupiny pacientů ( $p<0,01$ ,

respektive  $p < 0,05$ ). V případě pacientů po změně imunosuprese z CNI na mTOR inhibitor bylo stejné pozorování učiněno jen v případě *CYP3A5* polymorfismu (Obrázek 2.2). Hladiny mTOR inhibitorů v 1., 3. a 6. měsíci léčby těsně korelovaly s hodnotami proteinurie v 6. měsíci v rámci celé kohorty pacientů (Obrázek 2.3) a s cholesterolemii ve 3. měsíci. Asociace *CYP3A* AAGG a AAGA haplotypů s cholesterolemii ve 3. měsíci byla na hranici statistické významnosti ( $p = 0,053$ ). Farmakogenetická analýza *CYP3A4-CYP3A5* haplotypů prokázala významné rozdíly v biologické dostupnosti i hladinách léků v 1. měsíci léčby a hladinách léků ve 3. měsíci léčby (Tabulka 2.2). Lineární regresní model neprokázal souvislost hladin mTOR inhibitorů a proteinurie v 6. měsíci, byla-li analýza provedena pro skupiny pacientů léčených sirolimem, everolimem a po konverzi na mTOR inhibitor odděleně. *ABCB1/MDR1* lokusy nebyly asociovány s variabilitou biologické dostupnosti či hladin mTOR inhibitorů.

#### 9.2.2.5. CYP3A haplotypy ve vztahu k nežádoucím účinkům terapie mTOR inhibitory

Na základě předchozích analýz lze konstatovat, že *CYP3A* haplotypy jsou asociovány jak se vznikem nežádoucích účinků terapie mTOR inhibitory, tak s jejich hladinami a biologickou dostupností. Metodou multivariantní logistické regrese byly *CYP3A* haplotypy a hladiny mTOR inhibitorů verifikovány jako nezávislé prediktory cholesterolemie vyšší než 6 mmol/l ve 3. měsíci ( $p = 0,006$ ,  $p < 0,001$ ), respektive proteinurie vyšší než 0,5 g/d a proteinurie vyšší než 1,5 g/d v 6. měsíci ( $p = 0,017$ ,  $p = 0,042$ ). Relativní příspěvek *CYP3A* haplotypů ke zpřesnění predikčního modelu- ROC analýzy, konstruovaného na podkladě výsledků multivariantní logistické regrese, činil 3,1%, 2,1% and 1,2% (cholesterolemie, proteinurie vyšší než 0,5 g/d, proteinurie vyšší než 1,5 g/d). *CYP3A* haplotypy tedy představovaly nezávislé rizikové faktory vzniku těchto nežádoucích účinků léčby mTOR inhibitory.

#### 9.2.2.6. Farmakologické interakce a konkomitantní farmakoterapie

Ve skupině pacientů léčených mTOR inhibitory *de novo* po transplantaci ledviny byla pozorována interakce těchto léčiv s kalcineurinovými inhibitory. U pacientů léčených mTOR



inhibitorem a kalcineurinovým inhibitorem zároveň byla naměřena statisticky významně vyšší biologická dostupnost mTOR inhibitoru (C/D/kg) ve srovnání s pacienty léčenými jen mTOR inhibitorem ( $0,04 \pm 0,03$  vs.  $0,02 \pm 0,01$ ,  $p=0,047$ ). Tento rozdíl nebyl statisticky významný, byla-li srovnávána příslušná data v rámci celého souboru, tedy i u pacientů po konverzi na mTOR inhibitor.

Z celkového počtu 184 pacientů jich 25 (13,6%) užívalo ACE inhibitor či AT1 blokátor *de novo* v prvních 6 měsících po zahájení terapie mTOR inhibitorem jako antiproteinurickou léčbu. U 53 pacientů (28,8%) byla ve stejném časovém období podávána hypolipidemika. Z těchto 53 pacientů jich hypolipidemika užívalo 49 (92,4%) již před zahájením terapie mTOR inhibitorem (průměr, 13,75 měsíců; rozmezí, 4,72-128,43 měsíců). Distribuce zastoupení výše uvedené farmakoterapie byla mezi jednotlivými genotypy a haplotypy homogenní.

### 9.2.3. Diskuse

Terapie mTOR inhibitory je spojena se vznikem mnoha specifických nežádoucích účinků, přičemž doposud nebyly identifikovány prediktivní faktory, které by umožnily identifikaci pacientů ve zvýšeném riziku vzniku těchto nežádoucích účinků léčby.

Haplotypová analýza představuje robustní statistickou metodu ke zhodnocení asociace genetických a klinických parametrů [140]. Bylo ukázáno, že haplotypové uspořádání *CYP3A* lokusu je nezávislým prediktorem vzniku anémie, dyslipidemie a proteinurie vzniklé při terapii mTOR inhibitory.

Anémie u pacientů léčených mTOR inhibitory je způsobena jednak poruchou metabolismu železa [172], ale také vlastním, na dávce závislým, antiproliferačním efektem sirolimu a everolimu na hematopoietické prekursory [173]. I zde byla incidence anémie nejvyšší u pacientů s haplotypem *CYP3A* AAGA, u kterého byly přítomny také nejvyšší hladiny mTOR inhibitorů. Multivariantní logistickou regresní analýzou však nebyl rizikový

*CYP3A* haplotyp definován jako nezávislý prediktor, ale jako rizikový faktor závislý-asociovaný s funkcí štěpu, zde vyjádřenou jako hodnota sérového kreatininu.

Dyslipidemie vznikající při terapii mTOR inhibitory zřejmě představuje komplexní metabolickou poruchu, která souvisí s dysfunkcí LDL receptoru a lipoproteinové lipasy [77]. *CYP3A* AAGA haplotyp je nezávislým rizikovým faktorem vzniku hypercholesterolemie ve 3. měsíci léčby mTOR inhibitory. Zároveň je asociován s biologickou dostupností sirolimu a everolimu (C/D/kg), což potvrzuje předpoklad závislosti nežádoucích účinků na dávce, respektive hladině léků [78].

Proteinurie představuje velmi častý vedlejší účinek léčby mTOR inhibitory a zároveň častou příčinu jejího předčasného ukončení [174]. Na jejím vzniku se podílí komplexní postižení glomerulů i tubulů způsobené dysfunkcí podocytů a poruchou exprese vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) [78]. V podmínkách této studie bylo možno demonstrovat významný vliv *CYP3A* haplotypů na vznik mírné (více než 0,5 g/d) i významné (více než 1,5 g/d) proteinurie v 6. měsíci léčby. Haplotypová struktura *CYP3A4-CYP3A5* představovala nezávislý rizikový faktor vzniku proteinurie.

Absenci asociace *CYP3A4-CYP3A5* haplotypů a biologické dostupnosti mTOR inhibitorů lze v případě této studie nejspíše vysvětlit přítomností konkomitantní terapie kalcineurinovými inhibitory. Kalcineurinové inhibitory a prednison, které jsou rovněž substráty CYP3A4 enzymů, modifikují biologickou dostupnost mTOR inhibitorů [63, 129]. Posouzení tohoto faktoru by vyžadovalo srovnání farmakokinetických parametrů v rámci příslušných podskupin, což by v případě předkládané studie vedlo k výraznému snížení statistické síly. Toto téma představuje velmi komplexní problém zasahující až do problematiky tkáňově specifického vlivu kalcineurinových inhibitorů na aktivitu CYP3A4 a CYP3A5 izoenzymů [175].

Na základě provedených analýz lze *CYP3A* polymorfismy považovat za genomické biomarkery biologické dostupnosti sirolimu a everolimu v intencích definice US FDA ([http://www.fda.gov/cder/genomics/genomic\\_biomarkers](http://www.fda.gov/cder/genomics/genomic_biomarkers)), zatímco *CYP3A* haplotypy představují nezávislé prediktory vzniku hypercholesterolemie a proteinurie u pacientů po transplantaci ledviny. I zde haplotypové uspořádání genového lokusu, ovlivňujícího určitý patogenetický mechanismus- biologickou dostupnost a tedy účinek léku, představovalo modifikátor fenotypu, zatímco analýza jednotlivých genových lokusů asociací s příslušným fenotypem neprokázala [140].

Pacienti léčení sirolimem nebo everolimem byli pro účely této studie součástí jedné skupiny. Přestože se některé farmakokinetické parametry obou léčiv liší, terapeutické rozmezí obou léků je srovnatelné a biologická dostupnost charakterizovaná parametrem C/D/kg je rovněž podobná. Dalším argumentem pro analýzu obou skupin pacientů jako celku je identický farmakodynamický efekt těchto léků, a také podobné spektrum nežádoucích účinků, přičemž doposud není k dispozici jejich přímé srovnání [176].

## 10. JEDNONUKLEOTIDOVÉ POLYMORFISMY V GENU *AGER* VE VZTAHU

### K HISTOLOGICKÝM NÁLEZŮM V TRANSPLANTOVANÉ LEDVINĚ

Potencionálně významným kandidátním genem uplatňujícím se v patogenezi vaskulárního poškození u pacientů s chronickým renálním onemocněním je gen *AGER* kódující receptor pro produkty pokročilé glykace proteinů (RAGE). Byla prokázána variabilita hladin RAGE u pacientů léčených dialýzou i transplantací ledviny [177-179]. Vztah polymorfismů tohoto genu a histologického nálezu v transplantované ledvině, respektive funkce štěpu u pacientů po transplantaci ledviny však není zcela jasný.

#### 10.1. Metody

##### 10.1.1. Soubor pacientů, detekce polymorfismů, laboratorní a histologické vyšetření

Ve studii zahrnující 145 pacientů po transplantaci kadaverozní ledviny, s imunosupresí založenou na kalcineurinovém inhibitoru (cyklosporin A nebo takrolimus), antimetabolitu (mykofenolát mofetil) a steroidu (prednison), u kterých nebyla použita indukční imunosuprese. V jednom roce po transplantaci byly prováděny protokolární biopsie, které byly vyhodnoceny dle kritérií Banff 97 [160]. Genomová DNA byla získána z periferních mononukleárních leukocytů standardním způsobem, analyzovány byly čtyři funkčně významné polymorfismy lokalizované v genu *AGER* (-429T/C (rs1800625), -374T/A (rs1800624), Gly82Ser (557 G/A, rs 2070600) and 2184A/G (rs13209119)). U pacientů ve stabilizovaném stavu (bez známek zánětu (CRP<8mg/l) byly v jednom roce po transplantaci sledovány následující laboratorní parametry- kreatinin, urea, celková bílkovina, cholesterol, triglyceridy, glykémie a odhadovaná glomerulární filtrace dle Cockrofta-Gaulta (C-G) [180] a MDRD [181].

### 10.1.2. Statistická analýza

Platnost Hardy-Weinbergova ekvilibria pro jednotlivé SNP a alelická frekvenční analýza byly provedeny  $\chi^2$  testem. Vztah sledovaných klinických parametrů a frekvence genových polymorfismů byl testován haplotypovou analýzou [164].

Srovnání mezi skupinami byla prováděna testy ANOVA, Kruskal-Wallis, t-testem, případně Wilcoxonovým testem. Pro porovnání spojitých veličin byl použit Pearsonův a Spearmanův korelační koeficient. Statistická síla příslušných srovnání byla kalkulována pomocí počítačového programu DSTPLAN. Za signifikantní byly považovány výsledky s hodnotou  $p < 0.05$ .

## 10.2. Výsledky

### 10.2.1. Charakteristika souboru pacientů, klinické a laboratorní nálezy

Ze 145 pacientů zahrnutých do studie bylo 95 (65,5%) mužů, u 63 (43,4%) pacientů byla v prvním roce po transplantaci detekována akutní rejekce. Průměrné hodnoty kreatininu, odhadované glomerulární filtrace (C-G, MDRD) a proteinurie byly  $147 \pm 89,4 \mu\text{mol/l}$ ,  $1,05 \pm 0,36 \text{ ml/s}$ ,  $0,84 \pm 0,29 \text{ ml/s}$  a  $0,6 \pm 1,8 \text{ g/den}$ . Histologické vyšetření prokázalo v 70 případech normální nález, v 15 vzorcích rejekční nález a v 60 vzorcích obraz chronické transplantální neuropatie (CAN).

Celý soubor pacientů byl pro potřeby dalších analýz posléze rozdělen na tři skupiny právě podle histologického nálezu v renální biopsii. Parametry charakterizující funkci transplantované ledviny v jednotlivých skupinách dle histologického nálezu (normální nález, rejekce, CAN)- tedy hodnota sérového kreatininu ( $126 \pm 39$ ,  $128$  ( $116-196$ ),  $154 \pm 44$ ) ( $p < 0,001$ ), glomerulární filtrace odhadovaná podle Cockrofta-Gaulta ( $1,13 \pm 0,37$ ,  $0,99 \pm 0,42$ ,  $0,98 \pm 0,32$ ) ( $p < 0,05$ ) a MDRD ( $0,92 \pm 0,29$ ,  $0,79 \pm 0,34$ ,  $0,76 \pm 0,24$ ) ( $p < 0,005$ ), respektive proteinurie ( $0,3 \pm 0,5$ ,  $0,5 \pm 0,8$ ,  $0,8 \pm 2,8$ ) ( $p < 0,05$ ), se statisticky významně lišily. Tato

signifikance byla dána zejména rozdílem hodnot ve skupině s normálním histologickým nálezem na jedné straně a nálezem rejekce, respektive CAN na straně druhé.

#### 10.2.2. Alelická asociační analýza, haplotypová analýza

Alelické frekvence i frekvence genotypů pro jednotlivé polymorfní lokusy byly konzistentní s Hardy-Weinbergovým ekvilibriem (data neukázána). Nebyl zaznamenán rozdíl v distribuci ani jednotlivých polymorfních alel ani jimi konstituovaných genotypů pro jednotlivé skupiny pacientů po transplantaci ledviny charakterizované příslušným histologickým nálezem.

Metodikou diskutovanou v předchozích oddílech bylo pro čtyři zkoumané polymorfní lokusy konstituováno celkem 16 různých haplotypů. Rozdíl v distribuci těchto haplotypů v jednotlivých skupinách (dle histologického nálezu v biopsii štěpu- normální nález, rejekce, CAN) však nebyl statisticky významný (data neukázána).

#### 10.3. Diskuse

Přestože je k dispozici mnoho informací o vztahu RAGE i jeho solubilní varianty (sRAGE) k procesu vaskulárního poškození obecně [182], existuje stále poměrně málo údajů o ovlivnění patofyziologických procesů spojených s transplantací solidních orgánů, jako například ischemicko reperfučního poškození [183] či ovlivnění imunitních reakcí při rejekci [184]. Některými studiemi byla prokázána souvislost hladin sRAGE a mortality pacientů po transplantaci ledviny [36]. Existují důkazy potvrzující protektivní roli některých genových variant RAGE [185] a naopak působení jiných variant jako rizikových faktorů progresu onemocnění cév či chronického zánětu, ale také například diabetické nefropatie [186]. Výsledky mnoha experimentálních i klinických studií věnujících se tomuto tématu bohužel doposud nepřinesly konzistentní a jednoduše interpretovatelné výsledky, které by bylo možno transformovat v doporučení pro diagnostiku a léčbu v běžné klinické praxi. Podobně na základě výsledků studie zkoumající funkční a strukturální vliv vybraných genových variant

RAGE na výsledky transplantace ledviny nelze konstatovat přítomnost statisticky ani klinicky významné asociace.

## 11. ZÁVĚRY

### 11.1. Farmakogenetika- imunosuprese kalcineurinovými inhibitory

#### 11.1.1. Variabilita farmakokinetických parametrů

*CYP3A* haplotypy ovlivňují variabilitu biologické dostupnosti (C/D/kg) takrolimu.

*ABCB1* haplotypy nemají vztah k farmakokinetickým parametrům u pacientů léčených takrolimem a *CYP3A* ani *ABCB1* haplotypy neovlivňují biologickou dostupnost cyklosporinu A.

Tyto závěry byly učiněny v podmínkách studie s dostatečnou statistickou silou, která umožnila detekci rozdílu v biologické dostupnosti (C/D/kg) pouhých 6,5%, což významně snižuje pravděpodobnost nezaznamenání skutečně přítomného rozdílu ve sledovaném parametru mezi jednotlivými haplotypy.

#### 11.1.2. Variabilita výsledků transplantace ledviny- riziko akutní rejekce

*ABCB1* polymorfismy modifikují riziko akutní rejekce u pacientů po transplantaci ledviny, což je pravděpodobně dáno faktem, že polymorfismy ovlivňují aktivitu P-glykoproteinu silněji než jednotlivé polymorfismy.

Riziko vzniku akutní rejekce, jehož nezávislým rizikovým faktorem jsou *ABCB1* haplotypy, nezávisí na variabilitě farmakokinetických parametrů.

*CYP3A* haplotypy jsou determinantami biologické dostupnosti takrolimu, jejíž variabilita však není v podmínkách terapeutického monitorování hladin klinicky relevantní a nevede k ovlivnění rizika vzniku akutní rejekce.

### 11.2. Farmakogenetika- imunosuprese mTOR inhibitory

#### 11.2.1. Variabilita farmakokinetických parametrů

*CYP3A4* -288AG, *CYP3A5* 6986GA genotypy jsou determinantami variability farmakokinetických parametrů mTOR inhibitorů.



Hladina mTOR inhibitorů koreluje s hladinami sérového cholesterolu a proteinurie ve 3. a 6. měsíci po zahájení léčby.

Haplotypy *CYP3A4-CYP3A5* determinují variabilitu biologické dostupnosti i hladin mTOR inhibitorů v 1. a 3. měsíci léčby.

#### 11.2.2. Variabilita nežádoucích účinků léčby

Haplotyp *CYP3A4-CYP3A5* AAGA je asociován se zvýšeným rizikem vzniku hypercholesterolemie a proteinurie u pacientů léčených mTOR inhibitory.

#### 11.3. Varianty genu *AGER* a histologický nález ve štěpu ledviny

Ani genetická analýza zaměřená na čtyři polymorfní alely genu *AGER*, respektive z nich odvozené genotypy, ani haplotypová analýza zkoumající asociaci 16 různých haplotypů konstituovaných výše uvedenými polymorfními alelami genu *AGER* neprokázala asociaci s histologickým nálezem v biopsii štěpu ledviny (normální nález, rejekce, CAN) v jednom roce po transplantaci.

## 12. POUŽITÁ LITERATURA

1. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, Held PJ, Port FK., *Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant*. N Engl J Med. , 1999. **23**(341): p. 1725-30.
2. U.S. Renal Data System: Excerpts from the USRDS 2001 Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States. Am J Kidney Dis., 2001. **38**: p. S1-S248.
3. U.S. Renal Data System: USRDS (2010) Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease And End-Stage Renal Disease in the United States. National Institute of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD. 2010.
4. Kahan BD, *Forty years of publication of transplantation proceedings--the second decade: the cyclosporine revolution*. Transplant Proc., 2009. **41**(5): p. 1423-37.
5. Health Resources and Services Administration, H.S.B., Division of Transplantation. Rockville, MD: 2007 *Annual Report of the U.S. Organ Procurement and Transplantation Network and the Scientific Registry of Transplant Recipients: Transplant Data 1997–2006*. In. 2007.
6. Meier-Kriesche HU, Li S, Gruessner RW, Fung JJ, Bustami RT, Barr ML, Leichtman AB, *Immunosuppression: evolution in practice and trends, 1994-2004*. Am J Transplant. , 2006. **6**(5 Pt 2): p. 1111-31.
7. Webster AC, Lee VW, Chapman JR, Craig JC, *Target of rapamycin inhibitors (sirolimus and everolimus) for primary immunosuppression of kidney transplant recipients: a systematic review and meta-analysis of randomized trials*. Transplantation., 2006. **81**(9): p. 1234-48.
8. Opelz G, Döhler B; Collaborative Transplant Study Report, *Influence of time of rejection on long-term graft survival in renal transplantation*. Transplantation. , 2008. **85**(5): p. 661-6.
9. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B, *Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era*. Am J Transplant., 2004. **3**(4): p. 378-83.
10. Meier-Kriesche HU, Baliga R, Kaplan B, *Decreased renal function is a strong risk factor for cardiovascular death after renal transplantation*. Transplantation. , 2003 **75**(8): p. 1291-5.
11. Israni AK, Snyder JJ, Skeans MA, Peng Y, Maclean JR, Weinhandl ED, Kasiske BL; PORT Investigators, *Predicting coronary heart disease after kidney transplantation: Patient Outcomes in Renal Transplantation (PORT) Study*. Am J Transplant., 2010. **10**(2): p. 338-53.
12. Sprangers B, Kuypers DR, Vanrenterghem Y, *Immunosuppression: Does One Regimen Fit All?* Transplantation., 2011.
13. Stegall MD, Park WD, Larson TS, Gloor JM, Cornell LD, Sethi S, Dean PG, Prieto M, Amer H, Textor S, Schwab T, Cosio FG, *The histology of solitary renal allografts at 1 and 5 years after transplantation*. Am J Transplant, 2011. **11**(4): p. 698-707.
14. Cole EH, Johnston O, Rose CL, Gill JS, *Impact of acute rejection and new-onset diabetes on long-term transplant graft and patient survival*. Clin J Am Soc Nephrol. , 2008. **3**(3): p. 814-21. Epub 2008 Mar 5.
15. Danovitch GM, *Handbook of kidney transplantation*. Vol. Fourth edition. 2005: Lippincott Williams and Wilkins. 242-247.

16. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, Halloran PF, Baldwin W, Banfi G, Collins AB, Cosio F, David DS, Drachenberg C, Einecke G, Fogo AB, Gibson IW, Glotz D, Iskandar SS, Kraus E, Lerut E, Mannon RB, Mihatsch M, Nankivell BJ, Nickleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Roberts I, Seron D, Smith RN, Valente M, *Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions*. Am J Transplant. , 2008. **4**(8): p. 753-60.
17. El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, Kremers WK, Amer H, Gloor JM, Cosio FG, *Identifying specific causes of kidney allograft loss*. Am J Transplant, 2009. **9**(3): p. 527-35.
18. Bodonyi-Kovacs G, Putheti P, Marino M, Avihingsanon Y, Uknis ME, Monaco AP, Strom TB, Pavlakis M, *Gene expression profiling of the donor kidney at the time of transplantation predicts clinical outcomes 2 years after transplantation*. Hum Immunol. , 2010. **71**(5): p. 451-5.
19. Waller JR, Nicholson ML, *Molecular mechanisms of renal allograft fibrosis*. Br J Surg. , 2001. **88**(11): p. 1429-41.
20. Baan CC, Weimar W, *Intragraft cytokine gene expression: implications for clinical transplantation*. Transpl Int., 1998. **11**(3): p. 169-80.
21. Khan F, Agrawal S, Agrawal S, *Genetic predisposition and renal allograft failure: implication of non-HLA genetic variants*. Mol Diagn Ther., 2006. **10**(4): p. 205-19.
22. Paul LC, Saito K, Davidoff A, Benediktsson H, *Growth factor transcripts in rat renal transplants*. Am J Kidney Dis., 1996. **28**(3): p. 441-50.
23. Nadeau KC, Azuma H, Tilney NL, *Sequential cytokine dynamics in chronic rejection of rat renal allografts: roles for cytokines RANTES and MCP-1*. Proc Natl Acad Sci U S A. , 1995. **92**(19): p. 8729-33.
24. Kitagawa K, Wada T, Furuichi K, Hashimoto H, Ishiwata Y, Asano M, Takeya M, Kuziel WA, Matsushima K, Mukaida N, Yokoyama H, *Blockade of CCR2 ameliorates progressive fibrosis in kidney*. Am J Pathol. , 2004. **165**(1): p. 237-46.
25. Eis V, Luckow B, Vielhauer V, Siveke JT, Linde Y, Segerer S, Perez De Lema G, Cohen CD, Kretzler M, Mack M, Horuk R, Murphy PM, Gao JL, Hudkins KL, Alpers CE, Gröne HJ, Schlöndorff D, Anders HJ, *Chemokine receptor CCR1 but not CCR5 mediates leukocyte recruitment and subsequent renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction*. J Am Soc Nephrol., 2004. **15**(2): p. 337-47.
26. Simeoni E, Vassalli G, Seydoux C, Ramsay D, Noll G, von Segesser LK, Fleury S, *CCR5, RANTES and CX3CR1 polymorphisms: possible genetic links with acute heart rejection*. Transplantation. , 2005. **80**(9): p. 1309-15.
27. Fischereder M, Luckow B, Hoher B, Wüthrich RP, Rothenpieler U, Schneeberger H, Panzer U, Stahl RA, Hauser IA, Budde K, Neumayer H, Krämer BK, Land W, Schlöndorff D, *CC chemokine receptor 5 and renal-transplant survival*. Lancet. , 2001. **357**(9270): p. 1758-61.
28. Heinold A, Opelz G, Döhler B, Scherer S, Ruhenstroth A, Tran TH, *Genetic polymorphisms of adhesion molecules and kidney transplant survival*. Transplantation. , 2010. **89**(9): p. 1079-87.
29. Brabcova I, Petrasek J, Hribova P, Hyklova K, Bartosova K, Lacha J, Viklický O, *Genetic variability of major inflammatory mediators has no impact on the outcome of kidney transplantation*. Transplantation. , 2007. **84**(8): p. 1037-44.
30. Vaughan R, Sacks S, *Genomics in human renal transplantation*. Curr Opin Immunol. , 2010. **22**(5): p. 689-93.
31. Kobayashi T, Yokoyama I, Inoko H, Naruse T, Hayashi S, Morozumi K, Uchida K, Nakao A, *Significance of transporter associated with antigen processing gene*

- polymorphism in living related renal transplantation.* Hum Immunol., 2000. **61**(7): p. 670-4.
32. Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall J, Zhang J, Cao R, Yan SD, Brett J, Stern D, *Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes.* J Clin Invest., 1995. **96**(3): p. 1395-403.
  33. Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, Wautier MP, Guillausseau PJ, Cao R, Hori O, Stern D, Schmidt AM, *Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats.* J Clin Invest., 1996. **97**(1): p. 238-43.
  34. Zeng S, Feirt N, Goldstein M, Guarrera J, Ippagunta N, Ekong U, Dun H, Lu Y, Qu W, Schmidt AM, Emond JC, *Blockade of receptor for advanced glycation end product (RAGE) attenuates ischemia and reperfusion injury to the liver in mice.* Hepatology., 2004. **39**(2): p. 422-32.
  35. Moser B, Szabolcs M, Ankersmit HJ, Lu Y, Qu W, Weinberg A, Herold KC, Schmidt AM, *Blockade of RAGE suppresses alloimmune reactions in vitro and delays allograft rejection in murine heart transplantation.* Am J Transplant., 2007. **7**(2): p. 293-302.
  36. Gross S, van Ree RM, Oterdoom LH, de Vries AP, van Son WJ, de Jong PE, Navis GJ, Zuurman MW, Bierhaus A, Gans RO, Bakker SJ, *Low levels of sRAGE are associated with increased risk for mortality in renal transplant recipients.* Transplantation., 2007. **84**(5): p. 659-63.
  37. Kalousová M, Brabcová I, Germanová A, Jáchymová M, Matl I, Mestek O, Bandúr S, Zima T, Viklický O., *RAGE polymorphisms, renal function and histological finding at 12 months after renal transplantation.* Clin Biochem. 2009 ;42(4-5):. , 2009. **42**(4-5): p. 347-52.
  38. Exner M, Böhmig GA, Schillinger M, Regele H, Watschinger B, Hörl WH, Raith M, Mannhalter C, Wagner OF, *Donor heme oxygenase-1 genotype is associated with renal allograft function.* Transplantation., 2004. **77**(4): p. 538-42.
  39. Baan C, Peeters A, Lemos F, Uitterlinden A, Doxiadis I, Claas F, Ijzermans J, Roodnat J, Weimar W, *Fundamental role for HO-1 in the self-protection of renal allografts.* Am J Transplant., 2004. **4**(5): p. 811-8.
  40. Courtney AE, McNamee PT, Middleton D, Heggarty S, Patterson CC, Maxwell AP, *Association of functional heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism with renal transplantation outcomes.* Am J Transplant., 2007. **7**(4): p. 908-13.
  41. Singh R, Srivastava P, Srivastava A, Mittal RD, *Matrix metalloproteinase (MMP-9 and MMP-2) gene polymorphisms influence allograft survival in renal transplant recipients.* Nephrol Dial Transplant., 2010. **25**(10): p. 3393-401. .
  42. Jacobson PA, Schaldt D, Israni A, Oetting WS, Lin YC, Leduc R, Guan W, Lamba V, Matas AJ; DeKAF Investigators, *Genetic and clinical determinants of early, acute calcineurin inhibitor-related nephrotoxicity: results from a kidney transplant consortium.* Transplantation., 2012. **93**(6): p. 624-31.
  43. Zhu LB, Xu Q, Hong CY, Yue Z, Zhang Y, Ye HN, Yuan Y, *XPC gene intron 11 C/A polymorphism is a predictive biomarker for the sensitivity to NP chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer.* Anticancer Drugs. , 2010. **21**(7): p. 669-73.
  44. Sosa-Pineda B, *The gene Pax4 is an essential regulator of pancreatic beta-cell development.* Mol Cells., 2004. **18**(3): p. 289-94.
  45. Carf ME, *Transcription factors regulating beta-cell function.* Eur J Endocrinol., 2006. **155**(5): p. 671-9.

46. Gaughan DJ, Kluijtmans LA, Barbaux S, McMaster D, Young IS, Yarnell JW, Evans A, Whitehead AS, *The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations*. *Atherosclerosis*, 2001. **157**(2): p. 451-6.
47. Winkelmayer WC, Kramar R, Curhan GC, Chandraker A, Endler G, Föding M, Hörl WH, Sunder-Plassmann G, *Fasting plasma total homocysteine levels and mortality and allograft loss in kidney transplant recipients: a prospective study*. *J Am Soc Nephrol*, 2005. **16**(1): p. 255-60.
48. Spector AA, Norris AW, *Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. **292**(3): p. C996-1012.
49. Nankivell BJ, Chapman JR, Bonovas G, Gruenewald SM, *Oral cyclosporine but not tacrolimus reduces renal transplant blood flow*. *Transplantation*, 2004. **77**(9): p. 1457-9.
50. Coto E, Távira B, *Pharmacogenetics of calcineurin inhibitors in renal transplantation*. *Transplantation*, 2009. **88**(3 Suppl): p. S62-7.
51. Staatz CE, Goodman LK, Tett SE, *Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I*. *Clin Pharmacokinet*, 2010. **49**(3): p. 141-75.
52. Garcia DA, Hylek E, *Warfarin pharmacogenetics*, in *N Engl J Med*. 2009. p. 2474.
53. Burckart GJ, Amur S, Goodsaid FM, Lesko LJ, Frueh FW, Huang SM, Cavaille-Coll MW., *Qualification of biomarkers for drug development in organ transplantation*. *Am J Transplant*. 2008 Feb;**8**(2):267-70. , 2008. **8**(2): p. 267-70.
54. Lesko LJ, Atkinson AJ Jr., *Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: criteria, validation, strategies*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001(41): p. 347-66.
55. [www.fda.gov](http://www.fda.gov).  
Dostupné z:  
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.DrugDetails>.  
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.DrugDetails>.
56. Hariharan S, Johnston CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D, *Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996*. *N Engl J Med*, 2000. **342**(9): p. 605-12.
57. Giese T, Zeier M, Meuer S, *Analysis of NFAT-regulated gene expression in vivo: a novel perspective for optimal individualized doses of calcineurin inhibitors*. *Nephrol Dial Transplant*, 2004(19 Suppl 4): p. iv55-60.
58. Kyhl LE, Rasmussen SN, Aarons L, Jensen SB, *Population pharmacokinetics of cyclosporine: influence of covariables and assessment of cyclosporine absorption in kidney, lung, heart and heart + lung transplanted patients*. *Transplant Proc*, 1998. **30**(5): p. 1680.
59. Venkatamaranan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warthy V et al., *Clinical pharmacokinetics of tacrolimus*. *Clin Pharmacokinet*, 1995. **29**(6): p. 404-30.
60. Clase CM, M.K., Kiberd BA, Lawen JG, West KA, Fraser AD et al., *Adequate early cyclosporin exposure is critical to prevent renal allograft rejection: patients monitored by absorption profiling*. *Am J Transplant*, 2002. **2**(8): p. 789-95.
61. Staatz C, Taylor P, Tett S., *Low tacrolimus concentrations and increased risk of early acute rejection in adult renal transplantation*. *Nephrol Dial Transplant*, 2001. **16**(9): p. 1905-9.

62. Wallemacq P, Armstrong VW, Brunet M, Haufroid V, Holt DW, Johnston A, Kuypers D, Le Meur Y, Marquet P, Oellerich M, Thervet E, Toenshoff B, Undre N, Weber LT, Westley IS, Mourad M., *Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: report of the European consensus conference*. Ther Drug Monit., 2009. **31**(2): p. 139-52.
63. Srinivas TR, Meier-Kriesche H, Kaplan B, *Pharmacokinetic principles of immunosuppressive drugs*. Am J Transplant., 2005. **5**(2): p. 207-17.
64. Evans WE, McLeod HL, *Pharmacogenomics-drug disposition, drug targets, and side effects*. N Engl J Med., 2003. **348**(6): p. 538-49.
65. MacPhee IA, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter ND, Johnston A et al., *The influence of pharmacogenetics on the time to achieve target tacrolimus concentrations after kidney transplantation*. Am J Transplant., 2004. **4**(6): p. 843.
66. Kalow W, Tang BK, Endrenyi L, *Hypothesis: comparisons of inter- and intra-individual variations can substitute for twin studies in drug research*. Pharmacogenetics., 1998. **4**(8): p. 283-9.
67. Honcharik N, Yatscoff RW, Jeffery JR, Rush DN., *The effect of meal composition on cyclosporine absorption*. Transplantation, 1991. **52**(6): p. 1087-9.
68. Tang C, Lin JH, Lu AY, *Metabolism- based drug- drug interactions: what determines individual variability in cytochrome P450 induction?* Drug Metab Dispos., 2005. **33**(5): p. 603-13.
69. Dunn CJ, Waqstaff A, Perry CM, Plosker GL, Goa KL, *Cyclosporin: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion- based formulation (neoral)I in organ transplantation*. Drugs, 2001. **61**(13): p. 1957-2016.
70. Mourad M, Wallemacq P, De Meyer M, Malaise J, De Pauw L, Eddour DC, Goffin E, Lerut J, Haufroid V, *Biotransformation enzymes and drug transporters pharmacogenetics in relation to immunosuppressive drugs: impact on pharmacokinetics and clinical outcome*. Transplantation, 2008. **15**(85 (7 Suppl)): p. S 19-24.
71. Morath C, Arns W, Schwenger V, Mehrabi A, Fonouni H, Schmidt J, Zeier M, *Sirolimus in renal transplantation*. Nephrol Dial Transplant., 2007. **22**(Suppl 8): p. viii61-viii65.
72. Geissler EK, Schlitt HJ, Thomas G, *mTOR, cancer and transplantation*. Am J Transplant., 2008 Nov;8(11):2212-8., 2008. **11**(8): p. 2212-8.
73. Neuhaus P, Klupp J, Langrehr JM, *mTOR inhibitors: an overview*. Liver Transpl., 2001. **7**(6): p. 473-84.
74. Chapman JR, Valantine H, Albanell J, Arns WA, Campistol JM, Eisen H, Frigerio M, Lehmkuhl H, Marcen R, Morris R, Nashan B, Pascual J, Pohanka E, Segovia J, Zuckermann A, *Proliferation signal inhibitors in transplantation: questions at the cutting edge of everolimus therapy*. Transplant Proc., 2007. **39**(10): p. 2937-50.
75. Wu MJ, Shu KH, Lian JD, Yang CR, Cheng CH, Chen CH, *Impact of variability of sirolimus trough level on chronic allograft nephropathy*. Transplant Proc., 2008 **40**(7): p. 2202-5.
76. Kahan BD, Napoli KL, Kelly PA, Podbielski J, Hussein I, Urbauer DL, Katz SH, Van Buren CT, *Therapeutic drug monitoring of sirolimus: correlations with efficacy and toxicity*. Clin Transplant., 2000. **14**(2): p. 97-109.
77. Kasiske BL, de Mattos A, Flechner SM, Gallon L, Meier-Kriesche HU, Weir MR, Wilkinson A., *Mammalian target of rapamycin inhibitor dyslipidemia in kidney transplant recipients*. Am J Transplant., 2008. **7**(8): p. 1384-92.

78. Letavernier E, Bruneval P, Vandermeersch S, Perez J, Mandet C, Belair MF, Haymann JP, Legendre C, Baud L, *Sirolimus interacts with pathways essential for podocyte integrity*. Nephrol Dial Transplant., 2009. **24**(2): p. 630-8.
79. Lampen A, Zhang Y, Hackbarth I, Benet LZ, Sewing KF, Christians U, *Metabolism and transport of the macrolide immunosuppressant sirolimus in the small intestine*. J Pharmacol Exp Ther., 1998. **285**(3): p. 1104-12.
80. Anglicheau D, Le Corre D, Lechaton S, Laurent-Puig P, Kreis H, Beaune P, Legendre C, Thervet E, *Consequences of genetic polymorphisms for sirolimus requirements after renal transplant in patients on primary sirolimus therapy*. Am J Transplant., 2005. **5**(3): p. 595-603.
81. Sattler M, Guengerich FP, Yun CH, Christians U, Sewing KF., *Cytochrome P-450 3A enzymes are responsible for biotransformation of FK506 and rapamycin in man and rat*. Drug Metab Dispos., 1992. **20**(5): p. 753-61.
82. Fogel F, *Moderne Probleme der Humangenetik*. Ergebn. Inn. Med. Kinderheilkd., 1959. **12**: p. 52-125.
83. Meyer UA, *Pharmacogenetics - five decades of therapeutic lessons from genetic diversity*. Nat Rev Genet., 2004. **5**(9): p. 669-76.
84. Garrod AE, *The inborn errors of metabolism*. 1909, London, UK: Oxford Univ. Press.
85. Garrod AE, *The inborn factors of disease*. 1931, London, UK: Oxford Univ. Press.
86. www.fda.gov  
Dostupné z: <http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm129286.htm>.
87. Anglicheau D, Legendre Ch and Thervet E, *Pharmacogenetics in solid organ transplantation: present knowledge and future perspectives*. Transplantation, 2004. **78**(3): p. 311-5.
88. International HapMap Consortium; Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL et al., *A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs*. Nature., 2007. **449**(7164): p. 851-61.
89. Higashi MK, Veenstra DL, Kondo LM, Wittkowsky AK, Srinouanprachanh SL, Farin FM, Rettie AE., *Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy*. JAMA., 2002. **287**(13): p. 1690-8.
90. Rieder MJ, Reiner A, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, Blough DK, Thummel KE, Veenstra DL, Rettie AE, *Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose*. N Engl J Med., 2005. **22**(352): p. 2285-93.
91. www.fda.gov  
Dostupné z: <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2007/NEW01684.html>.
92. www.fda.gov  
Dostupné z: <http://www.fda.gov/cder/guidance/6400fnl.pdf>.
93. www.fda.gov  
Dostupné z: [http://www.fda.gov/cder/genomics/genomic\\_biomarkers\\_table.htm](http://www.fda.gov/cder/genomics/genomic_biomarkers_table.htm).
94. Wang L, McLeod HL, Weinshilboum RM, *Genomics and drug response*. N Engl J Med., 2011. **364**(12): p. 1144-53.
95. Takeuchi F, McGinnis R, Bourgeois S, Barnes C, Eriksson N, Soranzo N, Whittaker P, Ranganath V, Kumanduri V, McLaren W, Holm L, Lindh J, Rane A, Wadelius M, Deloukas P, *A genome-wide association study confirms VKORC1, CYP2C9, and CYP4F2 as principal genetic determinants of warfarin dose*. PLoS Genet., 2009. **5**(3: e1000433. Epub 2009 Mar 20.).

96. Schwarz UI, Ritchie M., Bradford Y, Li C, Dudek SM, Frye-Anderson A, Kim RB, Roden DM, Stein CM., *Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation*. N Engl J Med, 2008. **358**(10): p. 999-1008.
97. Ansell J, Hirsch J, Hylek E, Jacobson A, Crowther M, Palareti G; American College of Chest Physicians., *Pharmacology and management of the vitamin K antagonists: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition)*. Chest., 2008. **133**(6 Suppl): p. 160S-198S.
98. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, Walker JR, Antman EM, Macias W, Braunwald E, Sabatine MS, *Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel*. N Engl J Med., 2009. **360**(4 Epub 2008 Dec 22.): p. 354-62.
99. Wilke RA, Mareedu RK, Moore JH, *The Pathway Less Traveled: Moving from Candidate Genes to Candidate Pathways in the Analysis of Genome-Wide Data from Large Scale Pharmacogenetic Association Studies*. Curr Pharmacogenomics Person Med., 2008. **6**(3): p. 150-159.
100. Masuda S, Inui K, *An up-date review on individualized dosage adjustment of calcineurin inhibitors in organ transplant patients*. Pharmacol Ther., 2006 **112**(1): p. 184-98.
101. Undre NA, *Pharmacokinetics of tacrolimus-based combination therapies*. Nephrol Dial Transplant., 2003. **18**(Suppl 1): p. i12-5.
102. Murphy JE, *Clinical pharmacokinetics*. Fourth ed. 2008, Bethesda, Maryland: American Society of Health-System Pharmacists, Inc.
103. Budde K, Neumayer HH, Lehne G, Winkler M, Hauser IA, Lison A, Fritsche L, Souillou JP, Fauchald P, Dantal J; RADW 102 Renal Transplant Study Group., *Tolerability and steady-state pharmacokinetics of everolimus in maintenance renal transplant patients*. Nephrol Dial Transplant., 2004. **19**(10): p. 2606-14. .
104. Wrighton SA, Stevens JC, *The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism*. Crit Rev Toxicol., 1992. **22**(1): p. 1-21.
105. Paulussen A, Lavrijsen K, Bohets H, Hendrickx J, Verhasselt P, Luyten W, Konings F, Armstrong M, *Two linked mutations in transcriptional regulatory elements of the CYP3A5 gene constitute the major genetic determinant of polymorphic activity in humans* . Pharmacogenetics. 2000. (10): p. 415-424.
106. Watkins PB, Wrighton SA, Maurel P, Schuetz EG, Mendez-Picon G, Parker GA, Guzelian PS, *Identification of an inducible form of cytochrome P-450 in human liver* . Proc. Nat. Acad. Sci., 1985. **82**: p. 6310-6314.
107. Molowa DT, Schuetz EG, Wrighton SA, Watkins PB, Kremers P, Mendez-Picon G, Parker GA, Guzelian PS, *Complete cDNA sequence of a cytochrome P-450 inducible by glucocorticoids in human liver*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1986 **83**(14): p. 5311-5.
108. Lehmann JM, McKee D, Watson MA, Willson TM, Moore JT, Kliewer SA, *The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions*. J Clin Invest., 1998. **102**(5): p. 1016-23.
109. Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, Wein AJ, Malkowicz SB, *Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4*. J. Nat. Cancer Inst., 1998. **90**(16): p. 1225-9.
110. Aoyama T, Yamano S, Waxman DJ, Lapenson DP, Meyer UA, Fischer V, Tyndale R, Inaba T, Kalow W, Gelboin HV, Gonzalez FJ, *Cytochrome P-450 hPCN3, a novel cytochrome P-450 IIIA product that is differentially expressed in adult human liver: cDNA and deduced amino acid sequence and distinct specificities of cDNA-expressed hPCN1 and hPCN3 for the metabolism of steroid hormones and cyclosporine*. J. Biol. Chem., 1989. **264**: p. 10388-10395.



111. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J et al., *Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression*. Nat Genet., 2001. **27**(4): p. 383-91.
112. Riordan JR, Deuchars K, Kartner N, Alon N, Trent J, Ling V, *Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines*. Nature., 1985. **316**(6031): p. 817-9.
113. Callen DF, Baker E, Simmers RN, Seshadri R, Roninson IB, *Localization of the human multiple drug resistance gene, MDR1, to 7q21.1*. Hum Genet., 1987. **77**(2): p. 142-4.
114. Cascorbi I, *Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs*. Pharmacol Ther., 2006. **112**(2): p. 457-73.
115. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM, *Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter*. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1999. **39**: p. 361-98.
116. Juranka PF, Zastawny RL, Ling V, *P-glycoprotein: multidrug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins*. FASEB J., 1989. **3**(14): p. 2583-92.
117. Amirimani B, Ning B, Deitz AC, Weber BL, Kadlubar FF, Rebbeck TR, *Increased transcriptional activity of the CYP3A4\*1B promoter variant*. Environ Mol Mutagen., 2003. **42**(4): p. 299-305.
118. Hoffee PA, *Medical molecular genetics*. first ed. 1998, Pittsburgh, Pennsylvania, USA: Fence Creek publishing.
119. Amirimani B, Walker AH, Weber BL, Rebbeck TR, *RESPONSE: re: modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4*. J Natl Cancer Inst., 1999. **91**(18): p. 1588-90.
120. Ball SE, Scatina J, Kao J, Ferron GM, Fruncillo R, Mayer P et al., *Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promoter region of CYP3A4*. Clin Pharmacol Ther., 1999. **66**(3): p. 288-94.
121. Roy JN, Barama A, Poirier C, Vinet B, Roger M, *Cyp3A4, Cyp3A5, and MDR-1 genetic influences on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients*. Pharmacogenet Genomics, 2006. **16**(9): p. 659-65.
122. von Ahsen N, Richter M, Grupp C, Ringe B, Oellerich M, Armstrong VW, *No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a CYP3A4 promoter polymorphism (CYP3A4-V allele) on dose- adjusted cyclosporin A trough concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients*. Clin Chem., 2001. **47**(6): p. 1048-52.
123. Rivory LP, Qin H, Clarke SJ, Eris J, Duggin G, Ray E et al., *Frequency of cytochrome P450 3A4 variant genotype in transplant population and lack of association with cyclosporin clearance*. Eur J Clin Pharmacol., 2000. **56**(5): p. 395-8.
124. Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, van der Werf M, Gregoor PJ, Lindemans J, Weimar W, van Gelder T, *Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus*. Clin Pharmacol Ther., 2003. **74**(3): p. 245-54.
125. Hesselink DA, van Gelder T, van Schaik RH, Balk AH, van der Heiden IP, van Dam T et al., *Population pharmacokinetics of cyclosporine in kidney and heart transplant recipients and the influence of ethnicity and genetic polymorphisms in the MDR- 1, CYP3A4 and CYP3A5 genes*. Clin Pharmacol Ther., 2004. **76**(6): p. 545-56.
126. van Schaik RH, van der Heiden IP, van der Anker JN, Lindemans J., *CYP3A5 variant allele frequencies in Dutch Caucasians*. Clin Chem., 2002. **48**(10): p. 1668-71.
127. Thervet E, Anglicheau D, King B, Schlageter MH, Cassinat B, Beaune P et al., *Impact of cytochrome p450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and*

- concentration-to-dose ratio in renal transplant patients*. Transplantation, 2003. **76**(11): p. 1541-2.
128. Tada H, Tsuchiya N, Satoh S, Kagaya H, Li Z, Sato K, Miura M, Suzuki T, Kato T, Habuchi T, *Impact of CYP3A5 and MDR1(ABCB1) C3435T polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients*. Transplant Proc., 2005. **37**(4): p. 1730-2.
  129. Mourad M, Mourad G, Wallemacq P, Garrigue V, Van Bellingen C, Van Kerckhove V, De Meyer M, Malaise J, Eddour DC, Lison D, Squifflet JP, Haufroid V, *Sirolimus and tacrolimus trough concentrations and dose requirements after kidney transplantation in relation to CYP3A5 and MDR1 polymorphisms and steroids*. Transplantation, 2005. **80**(7): p. 977-84.
  130. MacPhee IA, Fredericks S, Mohamed M, Moreton M, Carter ND, Johnston A et al., *Tacrolimus pharmacogenetics: the CYP3A5\*1 allele predicts low dose-normalized tacrolimus blood concentrations in whites and South Asians*. Transplantation, 2005. **79**(4): p. 499-502.
  131. Renders L, Frisman M, Ufer M, Mosyagin I, Haenisch S, Ott U, Caliebe A, Dechant M, Braun F, Kunzendorf U, Cascorbi I, *CYP3A5 genotype markedly influences the pharmacokinetics of tacrolimus and sirolimus in kidney transplant recipients*. Clin Pharmacol Ther., 2007. **81**(2): p. 228-34.
  132. Haufroid V, Mourad M, Van Kerckhove V, Wawrzyniak J, De Meyer M, Eddour DC et al., *The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients*. Pharmacogenetics, 2004. **14**(3): p. 147-54.
  133. Anglicheau D, Thervet E, Etienne I, Hurault de Ligny B, Le Meur Y, Touchard G et al., *CYP3A5 and MDR1 genetic polymorphisms and cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation*. Clin Pharmacol Ther., 2004. **75**(5): p. 422-33.
  134. Fredericks S, Jorga A, MacPhee IA, Reboux S, Shiferaw E, Moreton M, Carter ND, Holt DW, Johnston A., *Multi-drug resistance gene-1 (MDR-1) haplotypes and the CYP3A5\*1 genotype have no influence on ciclosporin dose requirements as assessed by C0 or C2 measurements*. Clin Transplant., 2007. **21**(2): p. 252-7.
  135. Christians U, Strom T, Zhang YL, Steudel W, Schmitz V, Trump S, Haschke M., *Active drug transport of immunosuppressants: new insights for pharmacokinetics and pharmacodynamics*. Ther Drug Monit., 2006. **28**(1): p. 39-44.
  136. Hesselink DA, van Gelder T, van Schaik RH, *The pharmacogenetics of calcineurin inhibitors: one step closer toward individualized immunosuppression?* Pharmacogenomics., 2005. **6**(4): p. 323-37.
  137. Sakaeda T, Nakamura T, Okumura K, *Pharmacogenetics of MDR1 and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs*. Pharmacogenomics., 2003. **4**(4): p. 397-410.
  138. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, Johné A et al., *Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3473-8.
  139. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B et al., *The structure of haplotype blocks in the human genome*. Science., 2002. **296**(5576): p. 2225-9.
  140. Bandur S, Petrasek J, Hribova P, Novotna E, Brabcova I, Viklicky O., *Haplotypic structure of ABCB1/MDR1 gene modifies the risk of the acute allograft rejection in renal transplant recipients*. Transplantation, 2008 **86**(9): p. 1206-13.

141. Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent- Puiq P, Becquemont L, Schlageter MH, Cassinat B et al., *Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients*. J Am Soc Nephrol., 2003. **14**(7): p. 1955-7.
142. Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, Taylor A, Xie HG, McKinsey J, Zhou S, Lan LB, Schuetz JD, Schuetz EG, Wilkinson GR, *Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans*. Clin Pharmacol Ther., 2001. **70**(2): p. 189-99.
143. MacPhee IA, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter ND, Johnston A et al., *Tacrolimus pharmacogenetics: polymorphisms associated with expression of cytochrome p4503A5 and P-glycoprotein correlate with dose requirement*. Transplantation, 2002. **74**(11): p. 1486-9.
144. Fredericks S, Moreton M, Reboux S, Carter ND, Goldberg L, Holt DW et al., *Multidrug resistance gene-1 (MDR-1) haplotypes have a minor influence on tacrolimus dose requirements*. Transplantation, 2006. **82**(5): p. 705-8.
145. Foote CJ, Greer W, Kiberd B, Fraser A, Lawen J, Nashan B et al., *MDR1 C3435T polymorphisms correlate with cyclosporine levels in de novo renal recipients*. Transplant Proc., 2006. **38**(9): p. 2847-9.
146. Foote CJ, Greer W, Kiberd B, Fraser A, Lawen J, Nashan B et al., *Polymorphisms of multidrug resistance gene (MDR1) and cyclosporine absorption in de novo renal transplant patients*. Transplantation, 2007. **83**(10): p. 1380-84.
147. Hauser IA, Schaeffeler E, Gauer S, Scheuermann EH, Wegner B, Gossmann J et al., *ABCB1 Genotype of the Donor but Not of the Recipient Is a Major Risk Factor for Cyclosporine-Related Nephrotoxicity after Renal Transplantation*. J Am Soc Nephrol., 2005. **16**(5): p. 1501-1511.
148. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM, *A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity*. Science, 2007. **315**(5811): p. 525-8.
149. Salama NN, Yang Z, Bui T, Ho RJ, *MDR1 haplotypes significantly minimize intracellular uptake and transcellular P-gp substrate transport in recombinant LLC-PK1 cells*. J Pharm Sci., 2006. **95**(10): p. 2293-308.
150. Le Meur Y, Djebli N, Szlag JC, Hoizey G, Toupance O, Rérolle JP, Marquet P., *CYP3A5\*3 influences sirolimus oral clearance in de novo and stable renal transplant recipients*. Clin Pharmacol Ther., 2006. **80**(1): p. 51-60.
151. Mourad M, Mourad G, Wallemacq P, Garrigue V, Van Bellingen C, Van Kerckhove V, De Meyer M, Malaise J, Eddour DC, Lison D, Squifflet JP, Haufroid V, *Sirolimus and tacrolimus trough concentrations and dose requirements after kidney transplantation in relation to CYP3A5 and MDR1 polymorphisms and steroids*. Transplantation, 2005. **80**(7): p. 977-84.
152. Bandur S, Petrasek J, Hribova P, Novotna E, Brabcova I, Viklicky O., *Haplotypic arrangement in CYP3A locus is associated with side effects of proliferative signal inhibitors in renal transplant recipients*. Transplantation, 2011. **91**(1): p. e1-2.
153. Roy JN, Barama A, Poirier C, Vinet B, Roger M., *Cyp3A4, Cyp3A5, and MDR-1 genetic influences on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients*. Pharmacogenet Genomics., 2006. **16**(9): p. 659-65.
154. Barnard JB, Richardson S, Sheldon S, Fildes J, Pravica V, Hutchinson IV, Leonard CT, Yonan N, *The MDR1/ABCB1 gene, a high-impact risk factor for cardiac transplant rejection*. Transplantation, 2006. **82**(12): p. 1677-82.
155. Masuda S, Goto M, Fukatsu S, Uesugi M, Ogura Y, Oike F, Kiuchi T, Takada Y, Tanaka K, Inui K, *Intestinal MDR1/ABCB1 level at surgery as a risk factor of acute*

- cellular rejection in living-donor liver transplant patients*. Clin Pharmacol Ther., 2006. **79**(1): p. 90-102.
156. Tsuchiya N, Satoh S, Tada H, Li Z, Ohyama C, Sato K, Suzuki T, Habuchi T, Kato T, *Influence of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients*. Transplantation, 2004. **78**(8): p. 1182-7.
  157. Mai I, Perloff E, Bauer S, Goldammer M, Johne A, Filler G, Budde K, Roots I, *MDR1 haplotypes derived from exons 21 and 26 do not affect the steady-state pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant patients*. Br J Clin Pharmacol., 2004. **58**(5): p. 548-53.
  158. Hattersley AT, McCarthy MI, *What makes a good genetic association study?* Lancet, 2005. **366**(9493): p. 1315-23.
  159. Mondry A, Loh M, Laurence KB, Low N, *DNA polymorphisms and renal disease: a critical appraisal of studies presented at the annual ERA/EDTA and ASN conferences in 2004 and 2005*. Nephrol Dial Transplant. , 2006. **21**(10): p. 2775-9.
  160. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB, Furness P, Gaber LW, Gibson IW, Glotz D, Goldberg JC, Grande J, Halloran PF, Hansen HE, Hartley B, Hayry PJ, Hill CM, Hoffman EO, Hunsicker LG, Lindblad AS, Yamaguchi Y, et al., *The Banff 97 working classification of renal allograft pathology*. Kidney Int., 1999. **55**(2): p. 713-23.
  161. Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Roots I., *Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects*. Clin Pharmacol Ther., 2001. **69**(3): p. 169-74.
  162. *The International HapMap Project*. Nature., 2003. **426**(6968): p. 789-96.
  163. Excoffier L, Laval G, Schneider S, *Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis*. Evol Bioinform. Online, 2005. **1**: p. 47-50.
  164. Slatkin M, Excoffier L, *Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm*. Heredity., 1996. **76**(Pt 4): p. 377-83.
  165. Wasmuth HE, Matern S, Lammert F, *From genotypes to haplotypes in hepatobiliary diseases: one plus one equals (sometimes) more than two*. Hepatology, 2004. **39**(3): p. 604-7.
  166. Hull J, Rowlands K, Lockhart E, Sharland M, Moore C, Hanchard N, Kwiatkowski DP, *Haplotype mapping of the bronchiolitis susceptibility locus near IL8*. Hum Genet., 2004. **114**(3): p. 272-9.
  167. Kirkwood BJS, *Essential medical statistics. 2nd ed. Boston*. Blackwell Science, 2003: p. 426.
  168. Ioannidis JP, Trikalinos T, Khoury MJ, *Implications of small effect sizes of individual genetic variants on the design and interpretation of genetic association studies of complex diseases*. Am J Epidemiol., 2006. **167**(7): p. 609-14.
  169. Halloran PF, Helms LM, Kung L, Noujaim J, *The temporal profile of calcineurin inhibition by cyclosporine in vivo*. Transplantation, 1999. **68**(9): p. 1356-61.
  170. Sommerer C, Giese T, Schmidt J, Meuer S, Zeier M, *Ciclosporin A tapering monitored by NFAT-regulated gene expression: a new concept of individual immunosuppression*. Transplantation, 2008. **85**(1): p. 15-21.
  171. *Indicators and Strategies for Iron Deficiency and Anemia Programmes. Report of the WHO/UNICEF/UNU Consultation*. 1994, World Health Organization: Geneva, Switzerland.
  172. Maiorano A, Stallone G, Schena A, Infante B, Pontrelli P, Schena FP, Grandaliano G, *Sirolimus interferes with iron homeostasis in renal transplant recipients*. Transplantation, 2006. **82**(7): p. 908-12.

173. Sánchez Fructuoso A, Calvo N, Moreno MA, Giorgi M, Barrientos A, *Study of anemia after late introduction of everolimus in the immunosuppressive treatment of renal transplant patients*. Transplant Proc., 2007. **39**(7): p. 2242-4.
174. Büchler M, Caillard S, Barbier S, Thervet E, Toupance O, Mazouz H, Hurault de Ligny B, Le Meur Y, Thierry A, Villemain F, Heng AE, Moulin B, Morin MP, Noël C, Lebranchu Y; SPIESSER Group, *Sirolimus versus cyclosporine in kidney recipients receiving thymoglobulin, mycophenolate mofetil and a 6-month course of steroids*. Am J Transplant., 2007. **11**(7): p. 2522-31.
175. Picard N, Djebli N, Sauvage FL, Marquet P, *Metabolism of sirolimus in the presence or absence of cyclosporine by genotyped human liver microsomes and recombinant cytochromes P450 3A4 and 3A5*. Drug Metab Dispos., 2007. **35**(3): p. 350-5.
176. Rostaing L, Tran-Van T, Cointault O, et al. [abstract]. J Am Soc Nephrol 2001; **12**(suppl): 916.). , *Assessment of renal function in de novo renal transplant patients receiving either sirolimus or everolimus in addition to cyclosporine a*. J Am Soc Nephrol., 2001. **12** ((suppl)): p. 916.
177. Kalousová M, Hodková M, Kazderová M, Fialová J, Tesar V, Dusilová-Sulková S, Zima T, *Soluble receptor for advanced glycation end products in patients with decreased renal function*. Am J Kidney Dis., 2006. **47**(3): p. 406-11.
178. Kalousová M, Jáchymová M, Mestek O, Hodková M, Kazderová M, Tesar V, Zima T, *Receptor for advanced glycation end products--soluble form and gene polymorphisms in chronic haemodialysis patients*. Nephrol Dial Transplant., 2007. **22**(7): p. 2020-6.
179. Kalousová M, Bartosová K, Zima T, Skibová J, Teplan V, Viklický O, *Pregnancy-associated plasma protein a and soluble receptor for advanced glycation end products after kidney transplantation*. Kidney Blood Press Res., 2007. **30**(1): p. 31-7.
180. Cockcroft DW, Gault MH, *Prediction of creatinine clearance from serum creatinine*. Nephron., 1976. **16**(1): p. 31-41.
181. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D, *A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group*. Ann Intern Med. , 1999. **130**(6): p. 461-70.
182. Schmidt AM, Y.S., Yan SF, Stern DM., *The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses*. J Clin Invest, 2001. **108**(7): p. 949-55.
183. Moser B, Szabolcs MJ, Ankersmit HJ, Lu Y, Qu W, Weinberg A, Herold KC, Schmidt AM., *Blockade of RAGE suppresses alloimmune reactions in vitro and delays allograft rejection in murine heart transplantation*. Am J Transplant., 2007. **7**(2): p. 293-302.
184. Hou FF, Ren H, Owen WF Jr, Guo ZJ, Chen PY, Schmidt AM, Miyata T, Zhang X, *Enhanced expression of receptor for advanced glycation end products in chronic kidney disease*. J Am Soc Nephrol., 2004. **15**(7): p. 1889-96.
185. Falcone C, Geroldi D, Buzzzi MP, Emanuele E, Yilmaz Y, Fontana JM, Vignali L, Boiocchi C, Sbarsi I, Cuccia M., *The -374T/A RAGE polymorphism protects against future cardiac events in nondiabetic patients with coronary artery disease*. Arch Med Res., 2008. **39**(3): p. 320-5.
186. Prevost G, Fajardy I, Besmond C, Balkau B, Tichet J, Fontaine P, Danze PM, Marre M; Genediab and D.E.S.I.R studies., *Polymorphisms of the receptor of advanced glycation endproducts (RAGE) and the development of nephropathy in type 1 diabetic patients*. Diabetes Metab., 2005. **31**(1): p. 35-9.

### 13. PŘÍLOHY

Tabulka 1.1

Demografická, klinická a biochemická charakteristika souboru pacientů. Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka nebo jako průměr a 95% interval spolehlivosti.

	<b>Takrolimus</b>	<b>Cyklosporin A</b>	<b><i>p</i></b>
N	425	407	
Věk v době TxL (medián, rozmezí)	50 (17 - 76)	52 (19 - 79)	<0.001
Mužské pohlaví (n, %)	279 (65.7)	264 (64.9)	0.827
Kadaverozní transplantace ledviny	339	395	
Transplantace ledviny od žijícího dárce	86	12	<0.001
Počet transplantací (1/2/3/4)	356/58/9/2	357/42/6/2	0.428
Doba sledování (měsíce)	38 ± 19	63 ± 23	<0.001
Váha (kg)	76.2 ± 15.1	75.1 ± 13.8	0.296
Opožděný rozvoj funkce štěpu (n, %)	94 (22.1)	96 (23.6)	0.614
Hemoglobin (g/L)	101.8 ± 15.5	101.9 ± 14.3	0.968
Albumin (g/L)	34.7 ± 4.6	35.0 ± 4.9	0.629
Akutní celulární rejekce (n, %)	135 (31.8)	132 (32.4)	0.882
Tíže AR (BL, 1a, 1b, 2a, 2b, 3)	72/11/11/78/13/2	72/15/10/48/41/4	
Úvodní dávka prednisonu	21.8 ± 6.3	34.8 ± 7.9	<0.001
Počet neshod v HLA-A (průměr, 95% CI)	1.10 (1.03 – 1.16)	1.13 (1.06 – 1.19)	0.517
Počet neshod v HLA-B (průměr, 95% CI)	1.28 (1.22 – 1.34)	1.26 (1.20- 1.32)	0.456
Počet neshod v HLA-DR (průměr, 95% CI)	0.70 (0.63 – 0.76)	0.59 (0.53 – 0.65)	0.021
PRA aktivita max. (%)	22.19 (19.11 – 25.28)	20.65 (17.82 – 23.47)	0.476
PRA aktivita max. >50% (n, %)	75 (17.7)	63 (15.5)	0.158

Zkratky: TxL, transplantace ledviny ; HLA, human leukocyte antigen- antigeny hlavního histokompatibilitního komplexu; PRA, panel reaktivní protilátky; AR, akutní (celulární rejekce).

### Tabulka 1.2

Analyzované polymorfismy- porovnání četnosti výskytu jednotlivých polymorfních alel mezi pacienty s výskytem akutní rejekce (AR) a kontrolami (non-AR).

Hodnoty *P* vyjadřují asociaci s AR.

ID	Gen	Pozice	Alely	Heterozygosita		<i>p</i>
				AR	Non-AR	
rs2740574	<i>CYP3A4</i>	-288, promotor	A/G	0.044	0.051	0.475
rs776746	<i>CYP3A5</i>	+6986, intron 3	G/A	0.081	0.107	0.877
rs1128503	<i>ABCB1</i>	+1236, exon 12	C/T	0.454	0.477	0.986
rs2032582	<i>ABCB1</i>	+2677, exon 21	G/T/A	0.533	0.561	0.630
rs1045642	<i>ABCB1</i>	+3435, exon 26	C/T	0.466	0.501	0.712

Zkratky: AR, akutní rejekce



Tabulka 1.3

Frekvence jednotlivých haplotypů konstituovaných na principu EM algoritmu z polymorfních *ABCB1* +1236C>T, *ABCB1* +2677G>T>A, *ABCB1* +3435C>T genových lokusů u 251 pacientů s výskytem akutní rejekce (AR) a 533 kontrol (non-AR).

		AR	Non-AR	Asociace s AR		
	Haplotyp	N (%)	N (%)	Odds ratio	95 % CI	<i>p</i>
1.	T T T	181 (36.1)	419 (39.3)	0.87	0.70 – 1.01	0.22
2.	C G C	170 (33.9)	398 (37.3)	0.86	0.69 - 1.07	0.18
3.	C G T	66 (13.1)	103 (9.7)	1.42	1.02 – 1.97	0.04
4.	T G C	21 (4.2)	30 (2.8)	1.51	0.85 - 2.66	0.15
5.	C T C	17 (3.4)	27 (2.5)	1.35	0.73 - 2.50	0.34
6.	T G T	12 (2.4)	22 (2.1)	1.16	0.57 - 2.37	0.68
7.	T T C	10 (2.0)	13 (1.2)	1.65	0.72 - 3.77	0.24
8.	C T T	9 (1.8)	32 (3.0)	0.59	0.28 - 1.25	0.16
9.	C A T	9 (1.8)	5 (0.5)	3.88	1.29 – 116.2	0.01
10.	C A C	7 (1.4)	17 (1.6)	0.87	0.36 - 2.12	0.76

Zkratky: AR, akutní rejekce; CI, interval spolehlivosti.

Tabulka 1.4

Identifikace potencionálních nezávislých prediktorů přežití štěpu. Standardizovaný koeficient beta označuje směr (smysl ovlivnění hodnoceného parametru- pozitivně/negativně) a míru relativního příspěvku příslušné proměnné na hodnocený parametr- přežití štěpu.

<b>Proměnná</b>	<b>Standardizovaný koeficient beta</b>	<b><i>p</i></b>
Věk dárce	-0.142	<0.001
Věk příjemce v době transplantace	-0.130	<0.001
Opožděný rozvoj funkce štěpu	-0.128	<0.001
≥3 akutní rejekce	-0.107	0.001
Délka studené ischemie	-0.105	0.002
Pohlaví		0.702
Neshoda v antigenu HLA-A		0.881
Neshoda v antigenu HLA-B		0.269
Neshoda v antigenu HLA-DR		0.464
PRA aktivita max.		0.802
Úvodní dávka prednisonu		0.933
<i>ABCB1</i> haplotyp		0.996
<i>CYP3A</i> haplotyp		0.569
Anamnéza akutní rejekce		0.114

### Tabulka 2.1

Demografická, klinická a laboratorní data pacientů s imunosupresí mTOR inhibitory. Proměnné jsou vyjádřeny jako průměr ± standardní odchylka nebo medián a 95% interval spolehlivosti.

	<b>Sirolimus</b>	<b>Everolimus</b>	<b>Konverze</b>	<b><i>P</i></b>
	<b>(de novo)</b>	<b>(de novo)</b>	<b>(na sirolimus)</b>	
N	50	32	102	
Věk v době TxL (medián- roky, rozsah)	51 (25 - 68)	50 (25 – 65)	48 (18 – 71)	0.173
Pohlaví (n, %)	33 (66)	23 (71.9)	73 (73.7)	0.580
Kadaverozní TxL	44	32	86	0.064
TxL od žijícího dárce	6	0	13	
Počet transplantací (1/2/3)	47/3	32	83/12/7	0.024
Doba sledování (měsíce)	49 ± 24	61 ± 25	64 ± 34	0.015
Váha (kg)	77.4 ± 17.7	74.6 ± 13.7	80.3 ± 14.8	0.164
Hemoglobin (g/L)	101.0 ± 12.9	101.9 ± 17.4	116.7 ± 21.4	<0.001
Albumin (g/L)	35.4 ± 4.9	35.1 ± 5.0	39.4 ± 5.8	<0.001
Akutní rejekce (n, %)	16 (32)	7 (21.9)	50 (49)	0.077
PRA (%)	9.2 (4.5 – 13.9)	14.5 (7.9 – 20.9)	27.3 (21.1 – 33.5)	<0.001
Konkomitantní léčba CNI- CyA (n)	14	8	5	
Konkomitantní léčba CNI- Tak (n)	23	2	19	

Zkratky: TxL, transplantace ledviny; HLA, human leukocyte antigen; PRA, panel reactive antibodies; CNI, kalcineurinový inhibitor; CyA, cyclosporin A; Tak, takrolimus.

## Tabulka 2.2

Přehled rozdělení studijní populace podle použité kombinace imunosupresiv.

Imunosuprese	n	mTORI cíl. hladina (mg/d)	MMF (1/0)	Úvodní dávka CNI (mg/d)	CNI C/D/kg	Prednison- dávka (průměr)
<i>de novo</i>	Sir, CyA, 14 Pr		0	485±201	0.007±0. 004	31.5±8.2
	Sir, Tak, 23 Pr		0	15.8±3.6	0.013±0. 008	19.1±4.2
	Sir, 13 MMF, Pr		1			36.1±10.6
	Evr, CyA 8		0	287±46	0.005±0. 004	30.7±2.8
	Evr, CyA, 2 Pr		0	680±158	0.007±0. 005	37.5±7.0
	Evr, Tak, 22 Pr		0	7±1.4	0.019±0. 009	20
	Bez CNI 66		48			4±2.2
	Sir, CyA 13		4	80.6±56.4	50.3±44. 5	0
	Sir, Tak 23		4	3.8±2.7	10.4±7.1	4.5±1.5
<i>konverze</i>						

### Tabulka 2.3

Srovnání vazebné nerovnováhy (LD) v rámci *CYP3A* lokusu pro jednotlivé sledované klinické parametry.

	<b>Anémie</b>		<b>Hypercholesterolémie</b>		<b>PU &gt; 0.5</b>		<b>PU &gt; 1.5</b>	
status	1	0	1	0	1	0	1	0
čas (měsíce)	3		3		6		6	
LD ( $r^2$ )	0.274	0.740	0.307	0.469	0.245	0.628	0.124	0.528
<i>p</i>	0.019		0.025		0.018		0.019	

Pozn. Analýza byla provedena u celého souboru pacientů.

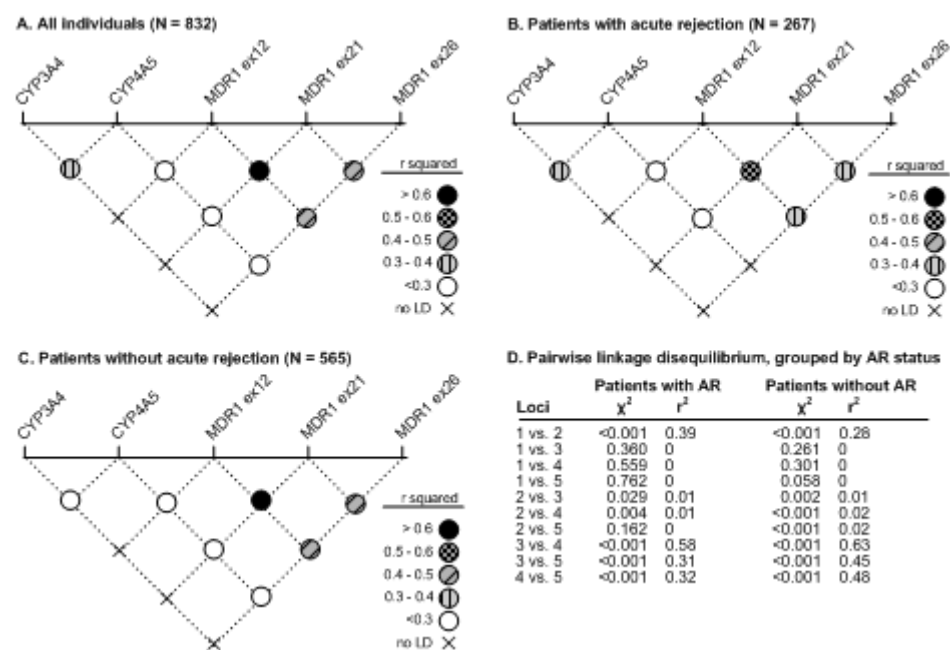
Status označuje přítomnost (1) nebo absenci (0) klinického parametru.

## Popis k obrázkům

### Obrázek 1.1

Vzájemné porovnání koeficientů  $r^2$  představujících míru vazebné nerovnováhy (LD) mezi 5 genomickými markery (*CYP3A4* -288A>G, *CYP3A5* +6986G>A, *ABCB1* +1236C>T, +2677G>T>A, +3435C>T), které byly použity k jejich konstrukci. U pacientů s výskytem akutní rejekce byla nalzena slabší vazebná nerovnováha (LD), což je konzistentní s vyšší frekvencí kombinací genotypů s alelami v *trans*-fázi v této skupině pacientů oproti kontrolní skupině.

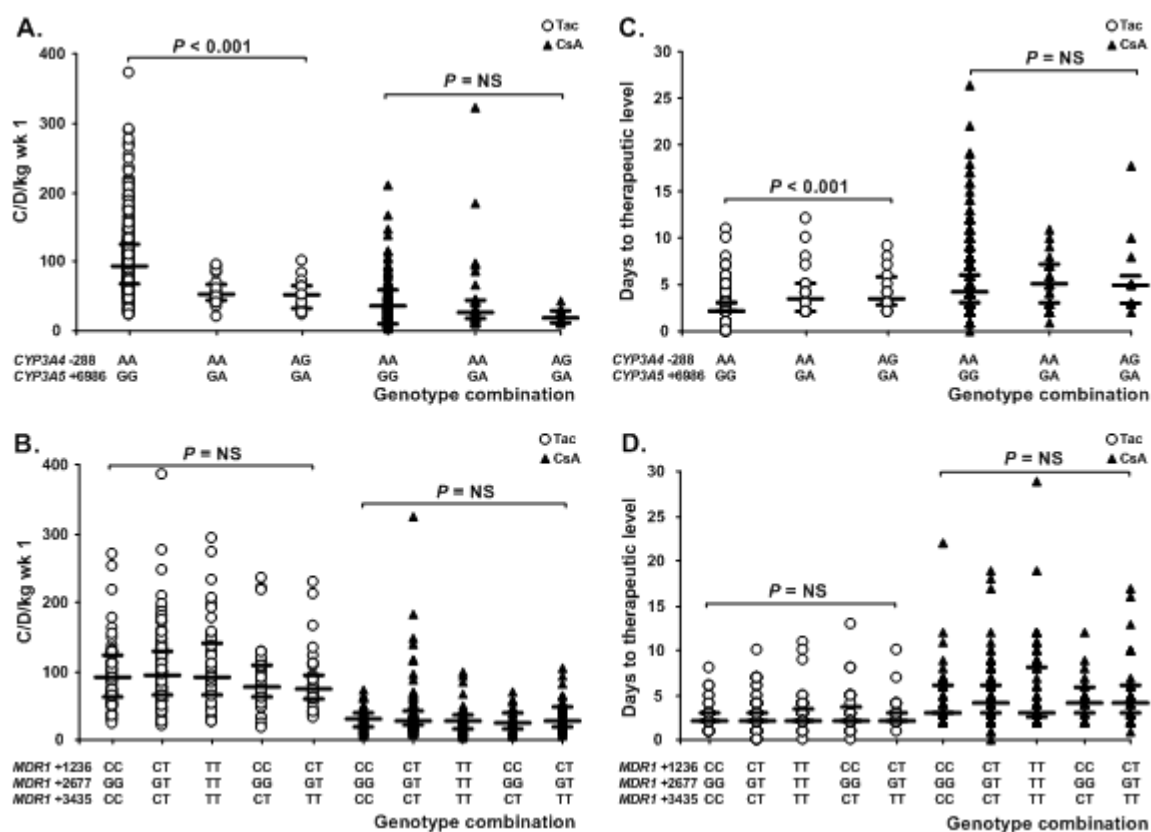
Pozn.  $\chi^2$  test je ukazatelem statistické signifikace rozdílu LD,  $r^2$  popisuje sílu vazebné nerovnováhy. Stejné vzdálenosti mezi jednotlivými genovými lokusy byly použity pouze pro potřeby tohoto a neodpovídají skutečné pozici jednotlivých genů na chromosomu.



## Obrázek 1.2

Vliv *CYP3A* a *ABCB1* haplotypů na hodnotu C/D/kg v 1. týdnu po transplantaci (Graf A, B) a na rychlost dosažení cílových hladin (Graf C, D) u pacientů léčených takrolimem (N=425) a cyklosporinem A (N=407). Vodorovné čáry představují medián a interkvartilové rozmezí. Genotypy s frekvencí výskytu nižší než 5% nejsou v grafu znázorněny.

Zkratky: Tac, takrolimus; CsA, cyklosporin A; NS, nesignifikantní rozdíl.

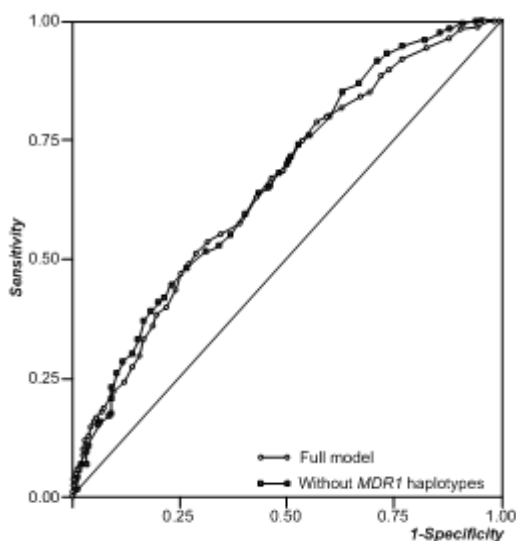




### Obrázek 1.3

Predikční model akutní rejekce transplantované ledviny založený na počtu neshod v HLA-DR antigenech, opožděném rozvoji funkce štěpu (DGF), věku příjemce v době transplantace (RTx) a *ABCB1* haplotypech. Parametry jsou seřazeny podle velikosti jejich relativního příspěvku ke vzniku akutní rejekce (Waldova statistika) s nejmenším, ještě signifikantním, příspěvkem *ABCB1* haplotypů. Případné vyřazení *ABCB1* haplotypů z predikčního modelu významně nemění plochu pod ROC křivkou (AUCROC) (AUROC = 0.66, 95% interval spolehlivosti (CI) 0.62-0.70 v modelu obsahujícím všechny parametry, vs. AUROC = 0.65, 95% CI 0.61-0.69 v modelu neobsahujícím *ABCB1* haplotypy). Vzhledem k tomu, že při výpočtech s *ABCB1* haplotypy byla použita logaritmická transformace není u nich uvedena hodnota OR a 95% CI, která by v tomto případě neposkytovala relevantní informaci.

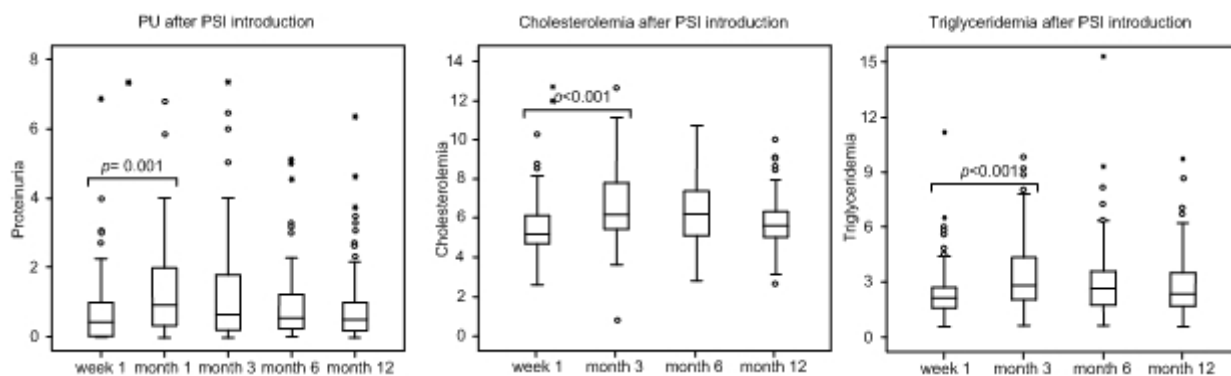
Zkratky: OR, odds ratio; CI, interval spolehlivosti.



Variable	Wald	OR	CI 95%	P
Mismatch-DR	20.2	1.80	1.39 – 2.33	<0.001
DGF	12.9	2.00	1.37 – 2.91	<0.001
Age at RTx	10.9	0.98	0.96 – 0.99	0.001
<i>MDR1</i> haplotypes	5.6	-	-	0.018
Immunosuppression	-	-	-	0.735
Sex	-	-	-	0.327
Age	-	-	-	0.164
Age of donor	-	-	-	0.944
Mismatch A	-	-	-	0.216
Mismatch B	-	-	-	0.509
Cold ischemia time	-	-	-	0.195
PRA max	-	-	-	0.972
Induction	-	-	-	0.827
Initial dose of prednisone	-	-	-	0.573

Obrázek 2.1.

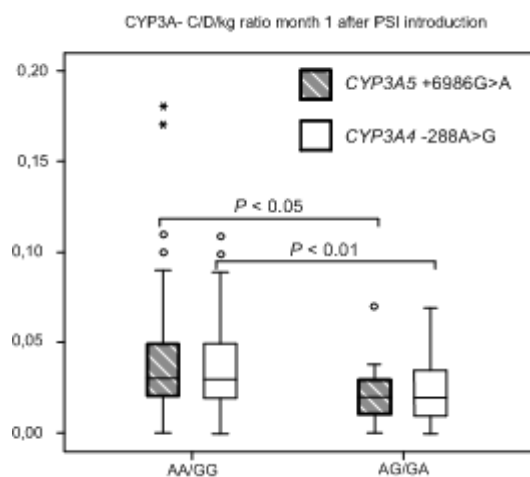
Trend ve vývoji proteinurie, cholesterolemie a triacylglycerolemie v jednotlivých obdobích po zahájení terapie mTOR inhibitory- bez ohledu na jednonukleotidové polymorfismy.



## Obrázek 2.2.

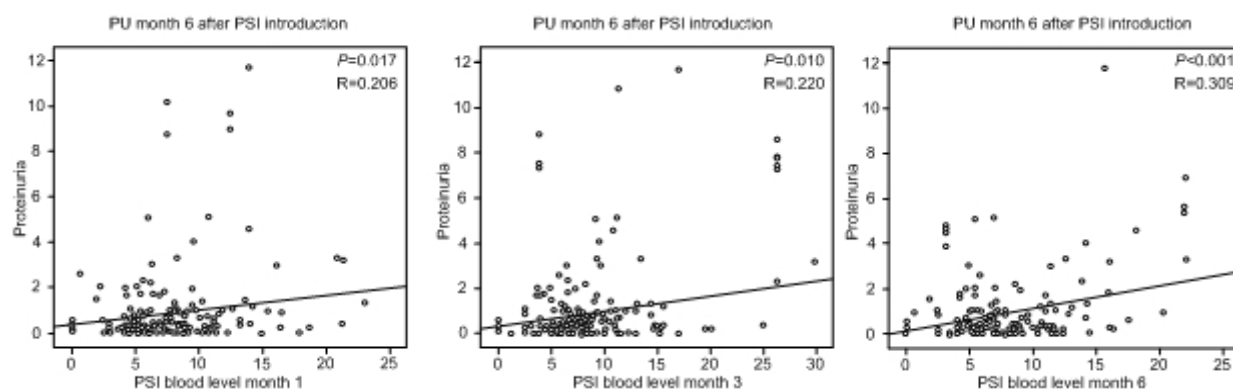
Asociace polymorfního lokusu *CYP3A* a biologické dostupnosti mTOR inhibitorů (C/D/kg) v 1. měsíci po zahájení terapie.

Pozn: *CYP3A4* (-288AA)/ *CYP3A5* (6986GG) a *CYP3A4* (-288AG)/ *CYP3A5* (6986GA) označují kombinace genotypů.



### Obrázek 2.3.

Asociace hladin mTOR inhibitorů s proteinurií v 6. měsíci po zahájení terapie.



#### 14. PUBLIKAČNÍ ČINNOST

[Haplotypic structure of ABCB1/MDR1 gene modifies the risk of the acute allograft rejection in renal transplant recipients.](#)

Bandur S, Petrasek J, Hribova P, Novotna E, Brabcova I, Viklicky O.

Transplantation. 2008 Nov 15;86(9):1206-13. (IF: 3,81)

PMID: 19005401

[Haplotypic arrangement in CYP3A locus is associated with side effects of proliferative signal inhibitors in renal transplant recipients.](#)

Bandur S, Petrasek J, Hribova P, Novotna E, Brabcova I, Viklicky O.

Transplantation. 2011 Jan 15;91(1):e1-2. (IF: 3,67)

PMID: 21441846

[A prospective longitudinal study of BK virus infection in 120 Czech renal transplant recipients.](#)

Girmanova E, Brabcova I, Bandur S, Hribova P, Skibova J, Viklicky O.

J Med Virol. 2011 May 26. doi: 10.1002/jmv.22106. [Epub ahead of print] (IF: 2,89)

PMID: 21618550

[Fibroblast growth factor 23 and matrix-metalloproteinases in patients with chronic kidney disease: are they associated with cardiovascular disease?](#)

Peiskerová M, Kalousová M, Kratochvílová M, Dusilová-Sulková S, Uhrová J, Bandúr S, Malbohan IM, Zima T, Tesar V.

Kidney Blood Press Res. 2009;32(4):276-83. Epub 2009 Oct 1. (IF: 1,71)

PMID: 19797911

[Molecular phenotypes of acute rejection predict kidney graft prognosis.](#)

Viklicky O, Hribova P, Volk HD, Slatinska J, Petrsek J, Bandur S, Honsova E, Reinke P.

J Am Soc Nephrol. 2010 Jan;21(1):173-80. Epub 2009 Sep 24. (IF: 7,69)

PMID: 19797166

[RAGE polymorphisms, renal function and histological finding at 12 months after renal transplantation.](#)

Kalousová M, Brabcová I, Germanová A, Jáchymová M, Matl I, Mestek O, Bandúr S, Zima T, Viklický O.

Clin Biochem. 2009 Mar;42(4-5):347-52. Epub 2008 Dec 24. (IF: 2,02)

PMID: 19133252

[Gliquidone therapy of new-onset diabetes mellitus after kidney transplantation.](#)

Tuerk TR, Bandur S, Nuernberger J, Kribben A, Mann K, Philipp T, Heemann U, Viklicky O, Witzke O.

Clin Nephrol. 2008 Jul;70(1):26-32. (IF: 1,41)

PMID: 18793545

[\[Kidney transplantation at the Institute for Clinical and Experimental Medicine\].](#)

Viklický O, Slatinská J, Bürgelová M, Vítko S, Urbanová M, Lazanská R, Hanzal V, Bandúr S, Teplan V, Matl I, Janousek L, Honsová E, Drastichová M, Malý J.

Cas Lek Cesk. 2011;150(1):56-9. Czech.

PMID: 21404490

## 15. PŘEDNÁŠKOVÁ ČINNOST, PREZENTACE VÝSLEDKŮ NA KONGRESECH

Kongres XVI ERA-EDTA, 10.- 13. května, 2008, Stockholm, Švédsko.

- abstrakt # 552294

- poster

[www.eraedta2008.org](http://www.eraedta2008.org)

32. kongres České nefrologické společnosti, 19.- 21.6.2008, Olomouc, Česká republika.

- přednáška

## 16. PŘÍLOHA PUBLIKACÍ



# Haplotypic Structure of *ABCB1/MDR1* Gene Modifies the Risk of the Acute Allograft Rejection in Renal Transplant Recipients

Stepan Bandur,<sup>1</sup> Jan Petrasek,<sup>2</sup> Petra Hribova,<sup>1</sup> Eva Novotna,<sup>1</sup> Irena Brabcova,<sup>1</sup> and Ondrej Viklicky<sup>1,3,4</sup>

**Background.** Bioavailability of tacrolimus (Tac) and cyclosporine is determined by cytochrome P450III<sub>A</sub> and by P-glycoprotein encoded by the *CYP3A4/CYP3A5* and *ABCB1* genes. Polymorphisms in these genes have been suggested to influence acute rejection and pharmacokinetics in renal transplantation. We aimed to validate these findings in a haplotype analysis.

**Methods.** A total of 832 renal transplant recipients were genotyped for the *CYP3A4* -288A>G, *CYP3A5* +6986G>A, *ABCB1* +1236C>T, +2677G>T>A, and +3435C>T polymorphisms. Their association with acute rejection and with pharmacokinetic parameters was analyzed in haplotype models.

**Results.** Apart from human leukocyte antigen-DR mismatches, delayed graft function and age at renal transplantation, acute rejection was also predicted by the [*ABCB1* +1236C; +2677G; +3435T] haplotype. Allograft survival was determined by donor age, age at renal transplantation, delayed graft function, cold ischemia, and history of more than two acute rejections. Homozygotes for the [*CYP3A4* -288A; *CYP3A5* +6986G] haplotype achieved earlier therapeutic concentrations of Tac and a higher concentration to dose ratio at week 1. *ABCB1* haplotypes did not influence pharmacokinetic parameters.

**Conclusions.** *ABCB1* haplotypes modify the risk of acute rejection, suggesting that *ABCB1* allelic arrangement is a stronger regulator of P-glycoprotein activity than single polymorphisms. The risk of acute rejection determined by *ABCB1* is independent of pharmacokinetic parameters. *CYP3A* haplotypes control the bioavailability of Tac, but do not modify the risk of acute rejection.

**Keywords:** Cyclosporine, Cytochrome P450, Haplotypes, Renal transplantation, P-glycoprotein, Pharmacogenetics, Single nucleotide polymorphism, Tacrolimus.

(*Transplantation* 2008;86: 1206–1213)

Tacrolimus (Tac) and Cyclosporine A (CsA), two cornerstones of immunosuppression in renal transplantation (RTx), show a high interindividual variability of pharmacokinetic profiles (1, 2) which poses difficulties in initial dosing and in attaining a narrow therapeutic range. Failure to achieve the therapeutic range in the early posttransplant period increases the risk of acute rejection (AR), whereas overdosing may elicit adverse effects (3, 4). Apart from environmental factors (5–8), it has been suggested that pharmacokinetic variability is also determined by variants of genes involved in drug metabolism (9).

The key proteins involved in biotransformation and transport of Tac and CsA include cytochrome P450III<sub>A</sub> (*CYP3A*), encoded by *CYP3A4* and *CYP3A5* genes, and P-glycoprotein (P-gp), encoded by *ABCB1* gene, also known as multidrug resistance gene 1 (*MDR1*) (10, 11). All genes are localized within a 10 million base-pair region at chromosome 7q and are in linkage disequilibrium. P-glycoprotein acts as transporter on the surface of enterocytes, hepatocytes, and leukocytes, and *CYP3A* influences pharmacokinetics of drugs by metabolism in the small intestine and liver (12, 13). Several polymorphisms with a significant impact on protein expression and function have been described (14). Accordingly, the *CYP3A4* -288A>G promoter polymorphism increases the expression of the gene (15) and *CYP3A5* +6986G>A polymorphism, localized in intron 3, increases the amount of the *CYP3A5* protein (16). The *ABCB1* +1236C>T, +2677G>T>A, and +3435C>T polymorphisms, localized in exons 12, 21, and 26, respectively, alter P-gp conformation and inhibit its function by changing the substrate specificity, which results in decreased activity of P-gp (14, 17).

Consequently, the role of these polymorphisms in the variability of pharmacokinetic parameters have been studied and several groups reported an association with dose-normalized blood concentrations and with the time needed to attain target drug concentrations (18–23). Also, an association of these polymorphisms with AR of nonrenal transplants has been reported (24, 25).

Indeed, these findings could be used in the identification of kidney allograft recipients predisposed to AR and thus potentially benefiting from tailored immunosuppression.

This study was supported by the grant NR/8816-3/2006 from the Czech Republic Ministry of Health and also by the Institute for Clinical and Experimental Medicine (MZO 0023001) (J.P.).

The authors does not have any commercial or professional conflict of interest in publishing this manuscript. The manuscript was neither funded nor prepared, in any part, by a commercial organization.

The first two authors contributed equally to the manuscript.

<sup>1</sup> Transplant Laboratory, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

<sup>2</sup> Laboratory of Experimental Hepatology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

<sup>3</sup> Department of Nephrology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

<sup>4</sup> Address correspondence to: Ondrej Viklicky, M.D., Ph.D., Department of Nephrology, Transplant Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958, 14021 – Prague, Czech Republic.

E-mail: [ondrej.viklicky@medicon.cz](mailto:ondrej.viklicky@medicon.cz)

Received 20 May 2008. Revision requested 11 June 2008.

Accepted 3 Jul 2008.

Copyright © 2008 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/08/8609-1206

DOI: 10.1097/TP.0b013e318187c4d1

However, numerous studies, particularly those on the association of *ABCB1* genotypes with AR, showed controversial results (18, 19, 23–27), which might have stemmed from incomplete adherence to the prerequisites for the design of genotype/phenotype association studies (28).

Therefore, in view of the small numbers of individuals involved in the studies resulting in inadequate statistical power, and the fact that only a minority of these studies used a haplotype analysis and none have been replicated in an independent sample of patients, we sought to investigate the role of these polymorphisms in a well-powered haplotype analysis based on data from a large cohort of patients who underwent RTx.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

We included 832 white patients who underwent RTx at the Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, the Czech Republic, from 1998 to 2006. In the posttransplant course, patients received CsA ( $n=407$ ) or Tac ( $n=425$ ) along with mycophenolate mofetil and steroids. Recipients with panel reactive antibodies (PRA) more than 50% or those receiving retransplants received induction immunosuppression with muromonab-OKT3 or antithymocyte globuline. Acute rejections were biopsy proven and were determined according to the Banff 97 criteria (29). Borderline changes were marked as AR. Clinical and laboratory data were collected at weeks 1 and 2 and at months 1, 3, 6, and 12 after RTx. In all patients, baseline diagnosis, number of human leukocyte antigen (HLA)-A, -B, -DR mismatches, PRA, cold ischemia time, initial dose of prednisone, immunosuppression regimen, concomitant medication, age at RTx, age of donor, occurrence of delayed graft function (DGF), and the number of AR were recorded.

Cyclosporine A and Tac were administered as Neoral (Novartis Ltd., Prague, Czech Republic) and Prograf (Astellas Pharma Ltd., Prague, Czech Republic), respectively. The initial dose of CsA, Tac, and mycophenolate mofetil were 8 mg/kg, 0.2 mg/kg, and 1000 mg, respectively, twice a day. A single intravenous dose of 500 mg methylprednisolone was given intraoperatively and on the first post-transplant day. Tapered prednisone dose was used for maintenance immunosuppression.

Blood trough concentrations of immunosuppressive drugs were measured by enzyme-multiplied immunoassay technique in samples obtained before the morning dose ( $C_0$ ). Target concentrations of CsA were 200 to 300 ng/mL during the first month, 150 to 250 ng/mL during the months 2 and 3, and 100 to 150 ng/mL after month 3. Target concentrations of Tac were 10 to 15 ng/mL during the first month, 5 to 15 ng/mL during the months 2 and 3, and 5 to 10 ng/mL after month 3.

All patients gave their informed consent to participate in the study and the local Ethical Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague approved the study protocol.

### Genotyping of Polymorphisms

Genomic DNA was isolated from blood samples using the DNA Purification Kit (Fermentas, Vilnius, Lithuania). Single nucleotide polymorphisms *CYP3A4* -288A>G,

*CYP3A5* +6986G>A, *MDR-1* +1236C>T, +2677G>T>A, and +3435C>T were determined by polymerase chain reaction followed by restriction fragment length polymorphism analysis as described previously (14, 15, 19, 30). To minimize genotyping errors, blank control wells were left on the polymerase chain reaction plates and the assays were wholly re-typed when the call rate was less than 90%. Three operators (P.H., E.N., and K.H.) independently performed genotype assignment. Genotyping was duplicated in case of discrepancy between the operators. After testing for Hardy-Weinberg equilibrium, allele frequencies were checked for consistency with data from Utah residents with a Northern and Western European ancestry (CEU) population from the HapMap database (31).

### Statistical Analysis

We calculated the sample size required to detect the effect of a haplotype on the concentration-to-dose per kilogram (C/D/kg) ratio using the DSTPLAN software (<http://linkage.rockefeller.edu/soft>). For the [*CYP3A4* -288A; *CYP3A5* +6986G] haplotype, which represents 80% of all *CYP* haplotypes, 329 carriers and 66 noncarriers were necessary to detect difference at least 12.5%. For the [*ABCB1* +1236C; +2677G; +3435C] and [*ABCB1* +1236T; +2677T; +3435T] haplotypes, being in 1:1 ratio, 406 individuals in both groups were required to detect a difference of at least 6.5%. Assuming a 30% prevalence of AR, the sample size allowed us to detect an association with an effect size of odds ratio greater than or equal to 2.3 (*CYP3A4* -288A>G, frequency 0.043) or greater than or equal to 1.4 (*ABCB1* +1236C>T, frequency 0.477). The calculations have been performed at 5% of significance for 80% statistical power.

One-way ANOVA, Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests, when appropriate, were used for comparison of continuous variables, and chi-squared or Fisher's exact test were used for comparison of proportions. Hardy-Weinberg equilibrium was tested by the exact test implemented in the Arlequin package (32). Single polymorphism associations were assessed using the Armitage test of trend (1 *df*). Haplotype frequencies at *CYP* and *ABCB1* loci were estimated using the Expectation-Maximization algorithm, which enables an estimation of haplotypes in unrelated individuals in the absence of family segregation data (33). Linkage disequilibrium (LD) coefficient  $r^2$ , ranging from 0 to 1, was calculated. The  $r^2$  equal to 1 indicates a perfect LD.

To test the association of the haplotypes at the *CYP* and *ABCB1* loci with acute rejection, the global test of differentiation based on Markov chain modeling was used (32). In this test, the global *P* value for difference in haplotype distribution is inherently adjusted for the number of haplotypes tested. Therefore, subsequent correction for multiple testing was not performed.

To assess the role of haplotypes and clinical variables in AR and the length of graft survival, stepwise logistic and linear regression was used, respectively. Predicted probability values for AR calculated in regression models were used to construct receiver operating characteristic curves. Goodness-of-fit and collinearity statistics were assessed for all regression models.

The level of significance was set at *P* less than 0.05. All *P* values were two sided. Gene linkage analysis was performed using the software Arlequin (32), all remaining

calculations were performed using SPSS version 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

## RESULTS

### Subject Characteristics

The age median of transplanted patients was 51 years (range, 17–79 years); 543 (65.3%) of them were male. The mean number of mismatches between donor and recipient in HLA-A, -B and -DR loci was  $3.0 \pm 1.2$  and the mean percentage of PRA was  $21.4 \pm 29.2$ . Donor age median was 48 years (range, 2–76 years). Within 12 months posttransplant period, AR was confirmed in 267 (32.1%) subjects. Graft survival rates at month 12 were 92.7% in patients treated with Tac and 91.9% in patients treated with cyclosporine. Patients treated with Tac were significantly younger at the time of RTx, had a higher ratio of living donor kidney transplantation, shorter duration of follow-up, lower dose of prednisone, and a higher number of HLA-DR mismatches (Table 1). Apart from that, no clinically meaningful differences between the groups were observed.

### Genetic Polymorphisms

#### Single Locus Analysis

All alleles of individual loci were in Hardy-Weinberg equilibrium, with nonsignificant chi-squared values in all groups. Locus-by-locus analysis did not show any association with AR. Also, there was no statistically significant difference in genotype frequencies between patients with AR and patients having Banff borderline changes (Table 2).

### Haplotype Analysis

There was a moderate LD between the polymorphisms within the *CYP3A4-CYP3A5* locus ( $P < 0.001$ ,  $r^2 = 0.31$ ) and within the *ABCB1* gene ( $P < 0.001$ ,  $r^2 = 0.41$ ). The LD between the *CYP3A4-CYP3A5* and *ABCB1* loci was significant, but weak ( $P < 0.001$ ,  $r^2 = 0.01$ ). Patients with AR had a stronger LD within the *CYP3A* locus, but a weaker LD within the *ABCB1* locus than controls (Fig. 1).

Accordingly, analysis of the *CYP3A-ABCB1* haplotypes based on all five polymorphisms showed a significant difference in the overall haplotypic distribution between patients with AR and controls (global  $P$  value = 0.02). In addition, separate analysis of the two *CYP3A* polymorphisms showed a nonsignificant difference in haplotype distribution between cases and controls ( $P = 0.17$ ), contrary to a significant difference when *ABCB1* haplotypes were analyzed separately ( $P = 0.003$ ). The significant difference in haplotype distribution at the *ABCB1* locus between both groups suggested that some of the haplotypes at this gene might be associated with AR.

Subsequent analysis of haplotypes at the *ABCB1* locus showed that the haplotype [*ABCB1* +1236C; +2677G; +3435T] increased the risk of AR 1.4 times ( $P = 0.038$ ) and was the one responsible for the significant finding of the test for LD difference (Table 3). Also, one minor haplotype was associated with AR. However, this haplotype was observed in less than 2% of individuals.

The two most frequent *ABCB1* haplotypes (T-T-T) or (C-G-C), not associated with AR, included only poly-

**TABLE 1.** Demographic, clinical, and biochemical data of patients

	Tacrolimus	Cyclosporine A	P
N	425	407	
Age at RTx, median (range) (yrs)	50 (17–76)	52 (19–79)	<0.001
Male, n (%)	279 (65.7)	264 (64.9)	0.827
Deceased donor renal transplantation (n)	339	395	<0.001
Living donor renal transplantation (n)	86	12	
Transplant number (1/2/3/4)	356/58/9/2	357/42/6/2	0.428
Follow-up (mo)	$38 \pm 19$	$63 \pm 23$	<0.001
Weight (kg)	$76.2 \pm 15.1$	$75.1 \pm 13.8$	0.296
Delayed graft function, n (%)	94 (22.1)	96 (23.6)	0.614
Hemoglobin (g/L)	$101.8 \pm 15.5$	$101.9 \pm 14.3$	0.968
Albumin (g/L)	$34.7 \pm 4.6$	$35.0 \pm 4.9$	0.629
Acute cellular rejection, n (%)	135 (31.8)	132 (32.4)	0.882
Grade of AR (BL, Ia, Ib, IIa, IIb, III)	72/11/11/78/13/2	72/15/10/48/41/4	0.950
Initial dose of prednisone (mg/d)	$21.8 \pm 6.3$	$34.8 \pm 7.9$	<0.001
Mismatch HLA-A, mean (95% CI)	1.10 (1.03–1.16)	1.13 (1.06–1.19)	0.517
Mismatch HLA-B, mean (95% CI)	1.28 (1.22–1.34)	1.26 (1.20–1.32)	0.456
Mismatch HLA-DR, mean (95% CI)	0.70 (0.63–0.76)	0.59 (0.53–0.65)	0.021
PRA activity max. (%)	22.19 (19.11–25.28)	20.65 (17.82–23.47)	0.476
PRA activity max. >50%, n (%)	75 (17.7)	63 (15.5)	0.158

Variables are expressed as mean  $\pm$  SD or mean and 95% confidence interval.

Note: As some patients presented with more than one episode of AR, their sum does not match the number of AR patients.

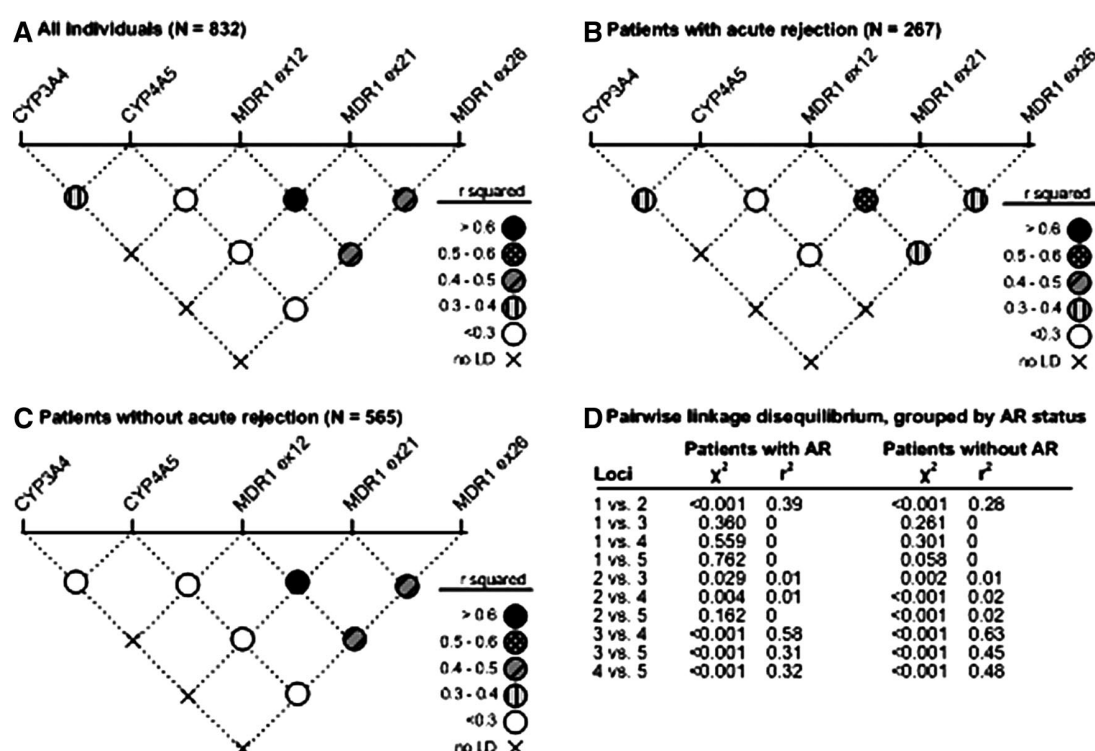
RTx, renal transplantation; HLA, human leukocyte antigen; PRA, panel reactive antibodies; AR, acute rejection; BL, borderline changes.

**TABLE 2.** Analyzed polymorphisms and single-locus comparison between patients with AR and controls (non-AR), and between AR patients without BL, and patients presenting with borderline changes only

ID	Gene	Position	Alleles	Heterozygosity		P	Heterozygosity		P
				AR	Non-AR		AR without BL	BL	
rs2740574	<i>CYP3A4</i>	−288	A/G	0.044	0.051	0.475	0.028	0.057	0.357
rs776746	<i>CYP3A5</i>	+6986	G/A	0.081	0.107	0.877	0.070	0.106	0.544
rs1128503	<i>ABCB1</i>	+1236	C/T	0.454	0.477	0.986	0.444	0.524	0.061
rs2032582	<i>ABCB1</i>	+2677	G/T/A	0.533	0.561	0.630	0.560	0.516	0.087
rs1045642	<i>ABCB1</i>	+3435	C/T	0.466	0.501	0.712	0.470	0.463	0.474

The first *P* values denote association of single polymorphisms with AR. The second *P* values were calculated to compare the heterozygosity between patients without and with BL.

AR, acute rejection; BL, borderline changes in biopsy.



**FIGURE 1.** Pairwise comparisons of the  $r^2$  measure of linkage disequilibrium (LD) between 5 markers (*CYP3A4* −288A>G, *CYP3A5* +6986G>A, *ABCB1* +1236C>T, +2677G>T>A, +3435C>T) used to assemble haplotypes. A weaker LD in the *ABCB1* gene, observed in patients with acute rejection (AR), is explained by a higher frequency of genotype combinations with alleles in *trans*-phase, compared with patients without AR. Note: Chi-squared statistics for the purpose of the figure.

morphic or wild-type alleles, respectively. In contrast, the haplotype (C-G-T), associated with AR, comprised wild type alleles *ABCB1* +1236C, +2677G, and the *ABCB1* +3435T polymorphism (Table 3). The association of the C-G-T haplotype with AR was complementary with our finding of a weaker LD within the *ABCB1* locus in AR patients than in controls (Fig. 1). A weaker LD favors recombination between the polymorphic loci and increases the proportion of individuals possessing genotype combinations with alleles in *trans*-phase.

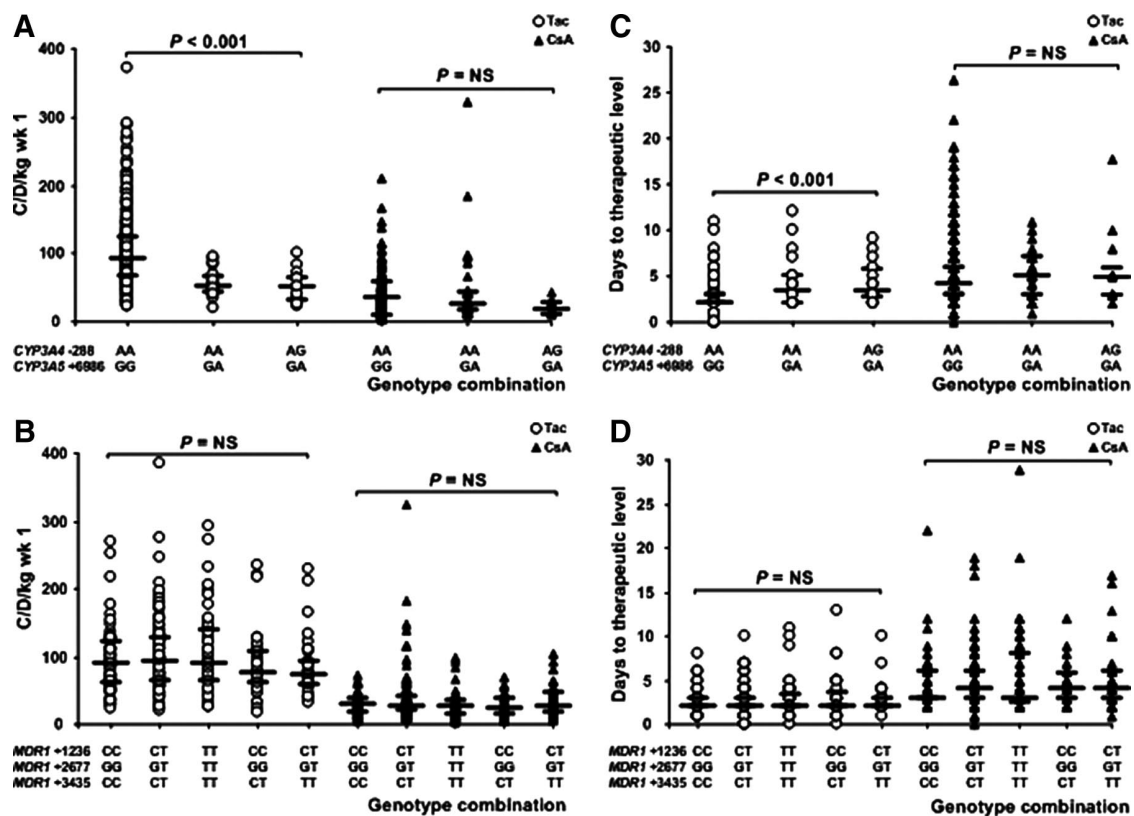
Individuals homozygous for the [*CYP3A4* −288A; *CYP3A5* +6986G] haplotype achieved target concentration of Tac earlier and showed a higher C/D ratio per kilogram of body weight (C/D/kg) at week 1 compared with carriers of other *CYP3A* haplotypes ( $2.5 \pm 1.3$  vs.  $3.8 \pm 2.8$  days,  $P < 0.001$ ; and  $103.3 \pm 58.6$  vs.  $56.7 \pm 20.9$  (ng/mL)/(mg/kg),  $P < 0.001$ , respectively). Because of the LD between the *CYP3A4* and *CYP3A5* genes, similar values were observed on independent analysis of both loci, that is,  $2.6 \pm 1.5$  days and  $101.0 \pm 58.2$  (ng/mL)/(mg/kg) for *CYP3A4* −288A homozygotes, and



**TABLE 3.** Estimated haplotype frequencies in the *ABCB1* +1236C>T, *ABCB1* +2677G>T>A, and *ABCB1* +3435C>T loci in 251 patients with AR and 533 controls (non-AR)

	Haplotype	AR, N (%)	Non-AR, N (%)	Association with AR		
				Odds ratio	95% CI	P
1.	TTT	181 (36.1)	419 (39.3)	0.87	0.70–1.01	0.217
2.	CGC	170 (33.9)	398 (37.3)	0.86	0.69–1.07	0.182
3.	CGT	66 (13.1)	103 (9.7)	1.42	1.02–1.97	0.038
4.	TGC	21 (4.2)	30 (2.8)	1.51	0.85–2.66	0.154
5.	CTC	17 (3.4)	27 (2.5)	1.35	0.73–2.50	0.340
6.	TGT	12 (2.4)	22 (2.1)	1.16	0.57–2.37	0.679
7.	TTC	10 (2.0)	13 (1.2)	1.65	0.72–3.77	0.235
8.	CTT	9 (1.8)	32 (3.0)	0.59	0.28–1.25	0.162
9.	CAT	9 (1.8)	5 (0.5)	3.88	1.29–116.2	0.009
10.	CAC	7 (1.4)	17 (1.6)	0.87	0.36–2.12	0.763

AR, acute rejection; CI, confidence interval.

**FIGURE 2.** The impact of *CYP3A* and *ABCB1* haplotypes on the C/D/kg ratio at week 1 (A, B) and on the achievement of therapeutic drug concentration (C, D) in patients with tacrolimus (n=425) and cyclosporine (n=407). Bars represent median and interquartile range. Genotypes with less than 5% frequency were omitted in the graph. Abbreviations: Tac, tacrolimus; CsA, cyclosporine A; NS, non-significant.

2.5±1.3 days and 103.1±58.5 (ng/mL)/(mg/kg) for *CYP3A5* +6986G homozygotes.

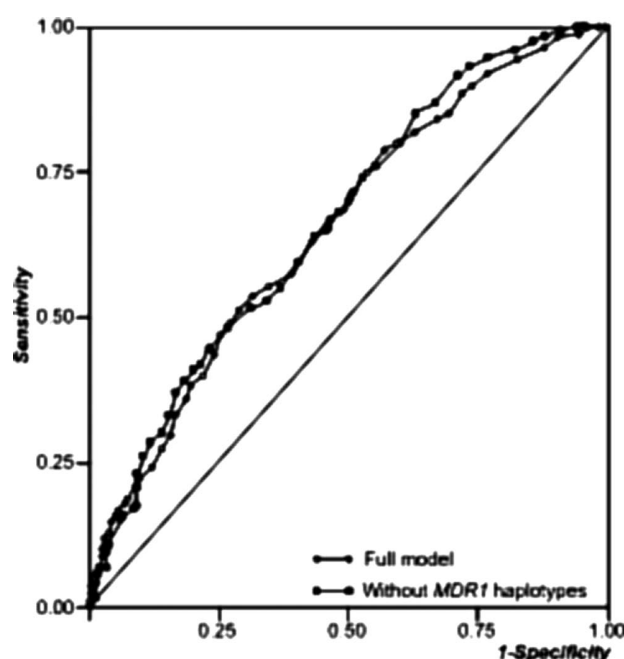
The *CYP3A4* and *CYP3A5* loci did not influence pharmacokinetic parameters of cyclosporine. Also, haplotypes at the *ABCB1* locus did not influence either of the pharmacological variables (Fig. 2).

### Variables Influencing Acute Rejection and Survival of Renal Allograft

Stepwise logistic regression analysis showed that AR is independently predicted by the number of HLA-DR mismatches, DGF, age at RTx, and also by *ABCB1* haplotypes. Despite the statistical significance, the relative contribution of

*ABCB1* haplotypes to AR was small. After the exclusion of *ABCB1* haplotypes from the prediction model, the area under the receiver operating characteristic curve for the diagnosis of AR was reduced only by 1% (Fig. 3).

Multivariate analysis showed that donor age, age at RTx, DGF, duration of cold ischemia time, and a history of three and more AR reduced renal allograft survival (Table 4).



Variable	Wald	OR	CI 95%	P
Mismatch-DR	20.2	1.80	1.39 – 2.33	<0.001
DGF	12.9	2.00	1.37 – 2.91	<0.001
Age at RTx	10.9	0.98	0.96 – 0.99	0.001
<i>MDR1</i> haplotypes	5.6	-	-	0.018
Immunosuppression	-	-	-	0.735
Sex	-	-	-	0.327
Age	-	-	-	0.164
Age of donor	-	-	-	0.944
Mismatch A	-	-	-	0.216
Mismatch B	-	-	-	0.509
Cold ischemia time	-	-	-	0.195
PRA max	-	-	-	0.972
Induction	-	-	-	0.827
Initial dose of prednisone	-	-	-	0.573

**FIGURE 3.** Prediction of acute allograft rejection (AR) based on the number of HLA-DR mismatches, delayed graft function (DGF), age at renal transplantation (RTx), and *ABCB1* haplotypes. Variables are sorted by their relative contribution to AR (Wald statistics), with the lowest impact attributable to *ABCB1* haplotypes. Accordingly, exclusion of *ABCB1* haplotypes did not significantly change the area under the receiver operating characteristics curve (AUROC) of the model (AUROC=0.66, 95% confidence interval [CI] 0.62–0.70 in the full model, vs. AUROC=0.65, 95% CI 0.61–0.69 in the model without *ABCB1* haplotypes). As *ABCB1* haplotypes were included after logarithmic transformation, OR and 95% CI do not provide relevant information and are not shown. Abbreviations: OR, odds ratio; CI, confidence interval.

**TABLE 4.** Variables independently predicting renal allograft survival

Variable	Standardized coefficient beta	P
Donor age	−0.142	<0.001
Age at transplantation	−0.130	<0.001
Delayed graft function	−0.128	<0.001
≥3 acute rejections	−0.107	0.001
Cold ischemia time	−0.105	0.002
Gender		0.702
Mismatch HLA-A		0.881
Mismatch HLA-B		0.269
Mismatch HLA-DR		0.464
PRA activity max.		0.802
Prednisone starting dose		0.933
<i>ABCB1</i> haplotype		0.996
<i>CYP3A</i> haplotype		0.569
History of acute rejection		0.114

The standardized coefficient beta denotes direction and the magnitude of the relative contribution of each variable to the outcome.

*CYP3A* and *ABCB1* haplotypes did not influence the graft survival.

## DISCUSSION

Studies on white RTx recipients have shown an association of the *CYP3A4* −288A>G, *CYP3A5* +6986G>A, *ABCB1* +1236C>T, *ABCB1* +2677G>T>A, and *ABCB1* +3435C>T polymorphisms with bioavailability of Tac and cyclosporine (18, 19, 21–23, 26, 34), supporting their role in metabolism and transport/absorption of calcineurine inhibitors. These polymorphisms with an in vitro proven function were included in our haplotype analysis that was enabled by the LD between them.

We demonstrated that the haplotypic structure of the *ABCB1* gene (i.e., the allelic arrangement on one chromosome) modifies the risk of AR. This finding is in contrast to the negative results of single locus analysis in our study and in other reports found in the literature (18, 19, 21). The explanation refers to the genetic linkage approach that provides more information than the analysis of individual polymorphisms. In some cases an association with complex phenotype might even be missed if only polymorphisms are analyzed instead of haplotypes (35).

When identifying loci associated with a disease, it would be optimal to test all polymorphisms in a candidate region. However, this approach would be inefficient, because polymorphisms give information about neighboring polymorphisms as a result of LD and are mostly not the cause of association but only markers of other polymorphisms (36). An alternative is to identify the sphere of influence of a disease-associated polymorphism by determining LD in the gene region. This approach, sensitive for detecting disease-associated loci in the studied gene region, requires a computational estimation of haplotypes (33). Assigning haplotypes only by counting cannot identify the allelic phase in subjects heterozygous at more than one site. These individuals must be excluded from the study, which limits the statistical power,

as shown in numerous negative studies (23, 26, 34, 37, 38). Phenotypic effect of several polymorphisms within a gene can depend on whether they occur on the same or opposite chromosome (*cis*- and *trans*-phase, respectively). Several polymorphisms in a particular phase can exert a large effect on the phenotype (39, 40), because their joint effect can have a larger influence on the protein function than any single amino acid change. To the best of our knowledge, our study is the first that reports an association of *ABCB1* haplotypes with AR in renal transplant patients.

Indeed, there are also reports on association of single *CYP3A* and *ABCB1* gene polymorphisms with the outcomes of organ transplantations (21, 22, 24, 25, 41). However, none of them are complied with the current demand for 80% power. Results obtained from inadequately powered studies have a decreased probability of detecting a true effect of a polymorphism because of the type II error (false negativity). Moreover, the proportion of false-positive results among all positive results (type I error) is increased as power decreases (42).

Importantly, statistical and clinical significances are not always equal. Our multivariate analysis, which was presented in none of the previous studies in RTx patients, showed that of four independent predictors of AR, the *ABCB1* haplotype was the least important one. Because of the strong impact of clinical variables on the outcome after RTx, the minor role of the *ABCB1* haplotype cannot be surprising, and is supported by our finding that the *ABCB1* haplotype increased risk of AR only 1.4 times. This result is compatible with Ioannidis et al. (43), who showed that the effects of polymorphisms/haplotypes associated with complex diseases are small and that most odds ratios range between 1.3 and 1.7. Genotype variants are therefore not causal, act as phenotype modifiers and can be hardly used in the clinical setting where the outcome is influenced by strong clinical determinants. Moreover, the determination of haplotypes in nonrelated individuals is carried out by mathematical modeling that cannot be applied to individual patients because of unknown allelic phase.

Rapid attainment of target concentrations of immunosuppressant in the early posttransplant period is a critical factor predicting the risk of AR (3, 4). Our observation that the haplotypes of the *CYP3A* locus strongly influence pharmacokinetic parameters of Tac, but not the risk of AR, are not surprising, because of the doses that are adjusted according to frequently monitored Tac trough concentrations. In our study, only the pharmacokinetic variability of Tac was determined by the *CYP3A4*-*CYP3A5* haplotype. Therefore, *CYP3A4* or *CYP3A5* genotyping might be of importance in assessing an optimal dose of Tac. As both loci are linked, genotyping of both of them seems unnecessary.

Our finding that *ABCB1* haplotypes do not have an impact on pharmacokinetic parameters, but influence the risk of AR, points at the role of P-glycoprotein in drug availability in immunocompetent cells. In carriers of *ABCB1* haplotypes that increase P-glycoprotein activity, the active concentrations of the drug inside the lymphocytes may be lower, despite normal blood concentrations. As a result, these haplotypes might increase the risk of AR.

Our results confirm the role of *CYP3A* haplotypes in pharmacokinetics of Tac. However, we show that the *ABCB1*

haplotype in patients treated with Tac and *CYP3A* and *ABCB1* haplotypes in patients treated with cyclosporine have a nonsignificant impact on drug disposition variability. Contrary to the previous reports (23, 26, 27, 34, 38), our study was sufficiently powered to detect a difference in concentration-to-dose ratio as small as 6.5% and the probability that we missed a true difference between the haplotype groups is small.

In conclusion, *ABCB1* haplotypes modify the risk of AR in RTx recipients, suggesting that *ABCB1* allelic arrangement is a stronger regulator of P-glycoprotein activity than single polymorphisms. The risk of AR determined by *ABCB1* is independent on pharmacokinetic parameters. On the contrary, *CYP3A* haplotypes control the bioavailability of Tac, but do not modify the risk of AR in a clinical setting. Our study emphasizes the importance of examining candidate genes using haplotyping approaches in well-powered studies.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Michael Nothnagel, Institute for Medical Informatics and Statistics, Christian-Albrecht University, Kiel, Germany, for a careful statistical revision of the manuscript. Eva Pokorna and Katerina Hyklova are acknowledged for their help with data analysis.

### REFERENCES

- Kyhl LE, Rasmussen SN, Aarons L, et al. Population pharmacokinetics of cyclosporine: Influence of covariables and assessment of cyclosporine absorption in kidney, lung, heart and heart + lung transplanted patients. *Transplant Proc* 1998; 30: 1680.
- Venkatamaranan R, Swaminathan A, Prasad T, et al. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* 1995; 29: 404.
- Clase CM, Mahalati K, Kiberd BA, et al. Adequate early cyclosporin exposure is critical to prevent renal allograft rejection: Patients monitored by absorption profiling. *Am J Transplant* 2002; 2: 789.
- Staatz C, Taylor P, Tett S. Low tacrolimus concentrations and increased risk of early acute rejection in adult renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1905.
- Honcharik N, Yatscoff RW, Jeffery JR, et al. The effect of meal composition on cyclosporine absorption. *Transplantation* 1991; 52: 1087.
- Tang C, Lin JH, Lu AY. Metabolism- based drug- drug interactions: What determines individual variability in cytochrome P450 induction? *Drug Metab Dispos* 2005; 33: 603.
- Dunn CJ, Waqstaff AJ, Perry CM, et al. Cyclosporin: An updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (neoral)1 in organ transplantation. *Drugs* 2001; 61: 1957.
- Srinivas TR, Meier-Kriesche HU, Kaplan B. Pharmacokinetic principles of immunosuppressive drugs. *Am J Transplant* 2005; 5: 207.
- Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: Translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999; 286: 487.
- McMillan MA. Clinical pharmacokinetics of cyclosporin. *Pharmacol Ther* 1989; 42: 135.
- Vincent SH, Karanam BV, Painter SK, et al. In vitro metabolism of FK-506 in rat, rabbit, and human liver microsomes: Identification of a major metabolite and of cytochrome P450 3A as a major enzymes responsible for its metabolism. *Arch Biochem Biophys* 1992; 294: 454.
- Cascorbi I. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol Ther* 2006; 112: 457.
- Lampen A, Christians U, Guengerich FP, et al. Metabolism of the immunosuppressant tacrolimus in the small intestine: Cytochrome P450, drug interactions, and interindividual variability. *Drug Metab Dispos* 1995; 23: 1315.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3473.
- Amirimani B, Ning B, Deitz AC, et al. Increased transcriptional activity

- of the CYP3A4\*1B promoter variant. *Environ Mol Mutagen* 2003; 42: 299.
16. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001; 27: 383.
  17. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, et al. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 2007; 315: 525.
  18. Haufroid V, Mourad M, van Kerckhove V, et al. The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 147.
  19. Tsuchiya N, Satoh S, Tada H, et al. Influence of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplantation* 2004; 78: 1182.
  20. Mourad M, Mourad G, Wallemacq P, et al. Sirolimus and tacrolimus trough concentrations and dose requirements after kidney transplantation in relation to CYP3A5 and MDR1 polymorphisms and steroids. *Transplantation* 2005; 80: 977.
  21. MacPhee IA, Fredericks S, Tai T, et al. The influence of pharmacogenetics on the time to achieve target tacrolimus concentrations after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4: 843.
  22. MacPhee IA, Fredericks S, Mohamed M, et al. Tacrolimus pharmacogenetics: the CYP3A5\*1 allele predicts low dose-normalized tacrolimus blood concentrations in whites and South Asians. *Transplantation* 2005; 79: 499.
  23. Foote CJ, Greer W, Kiberd B, et al. Polymorphisms of multidrug resistance gene (MDR1) and cyclosporine absorption in de novo renal transplant patients. *Transplantation* 2007; 83: 1380.
  24. Barnard JB, Richardson S, Sheldon S, et al. The MDR1/ABCB1 gene, a high-impact risk factor for cardiac transplant rejection. *Transplantation* 2006; 82: 1677.
  25. Masuda S, Goto M, Fukatsu S, et al. Intestinal MDR1/ABCB1 level at surgery as a risk factor of acute cellular rejection in living-donor liver transplant patients. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 79: 90.
  26. Fredericks S, Moreton M, Reboux S, et al. Multidrug resistance gene-1 (MDR-1) haplotypes have a minor influence on tacrolimus dose requirements. *Transplantation* 2006; 82: 705.
  27. Mai I, Perloff ES, Bauer S, et al. MDR1 haplotypes derived from exons 21 and 26 do not affect the steady-state pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant patients. *Br J Clin Pharmacol* 2004; 58: 548.
  28. Hattersley AT, McCarthy MI. What makes a good genetic association study? *Lancet* 2005; 366: 1315.
  29. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55: 713.
  30. Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, et al. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 169.
  31. The International HapMap Project. *Nature* 2003; 426: 789.
  32. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 2005; 1: 47.
  33. Slatkin M, Excoffier L. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm. *Heredity* 1996; 76 (Pt 4): 377.
  34. Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puiq P, et al. Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1955.
  35. Wasmuth HE, Matern S, Lammert F. From genotypes to haplotypes in hepatobiliary diseases: one plus one equals (sometimes) more than two. *Hepatology* 2004; 39: 604.
  36. Hull J, Rowlands K, Lockhart E, et al. Haplotype mapping of the bronchiolitis susceptibility locus near IL8. *Hum Genet* 2004; 114: 272.
  37. Fredericks S, Jorga A, MacPhee IA, et al. Multi-drug resistance gene-1 (MDR-1) haplotypes and the CYP3A5\*1 genotype have no influence on cyclosporin dose requirements as assessed by C0 or C2 measurements. *Clin Transplant* 2007; 21: 252.
  38. Anglicheau D, Thervet E, Etienne I, et al. CYP3A5 and MDR1 genetic polymorphisms and cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75: 422.
  39. Hollox EJ, Poulter M, Zvarik M, et al. Lactase haplotype diversity in the Old World. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 160.
  40. Tavtigian SV, Simard J, Teng DH, et al. A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p. *Nat Genet* 2001; 27: 134.
  41. Eng HS, Mohamed Z, Calne R, et al. The influence of CYP3A gene polymorphisms on cyclosporine dose requirement in renal allograft recipients. *Kidney Int* 2006; 69: 1858.
  42. Kirkwood BJS. Essential medical statistics [ed. 2]. Boston, Blackwell Science 2003, p 426.
  43. Ioannidis JP, Trikalinis TA, Khoury MJ. Implications of small effect sizes of individual genetic variants on the design and interpretation of genetic association studies of complex diseases. *Am J Epidemiol* 2006; 167: 609.



## Haplotypic Arrangement in CYP3A Locus Is Associated With Side Effects of Proliferative Signal Inhibitors in Renal Transplant Recipients

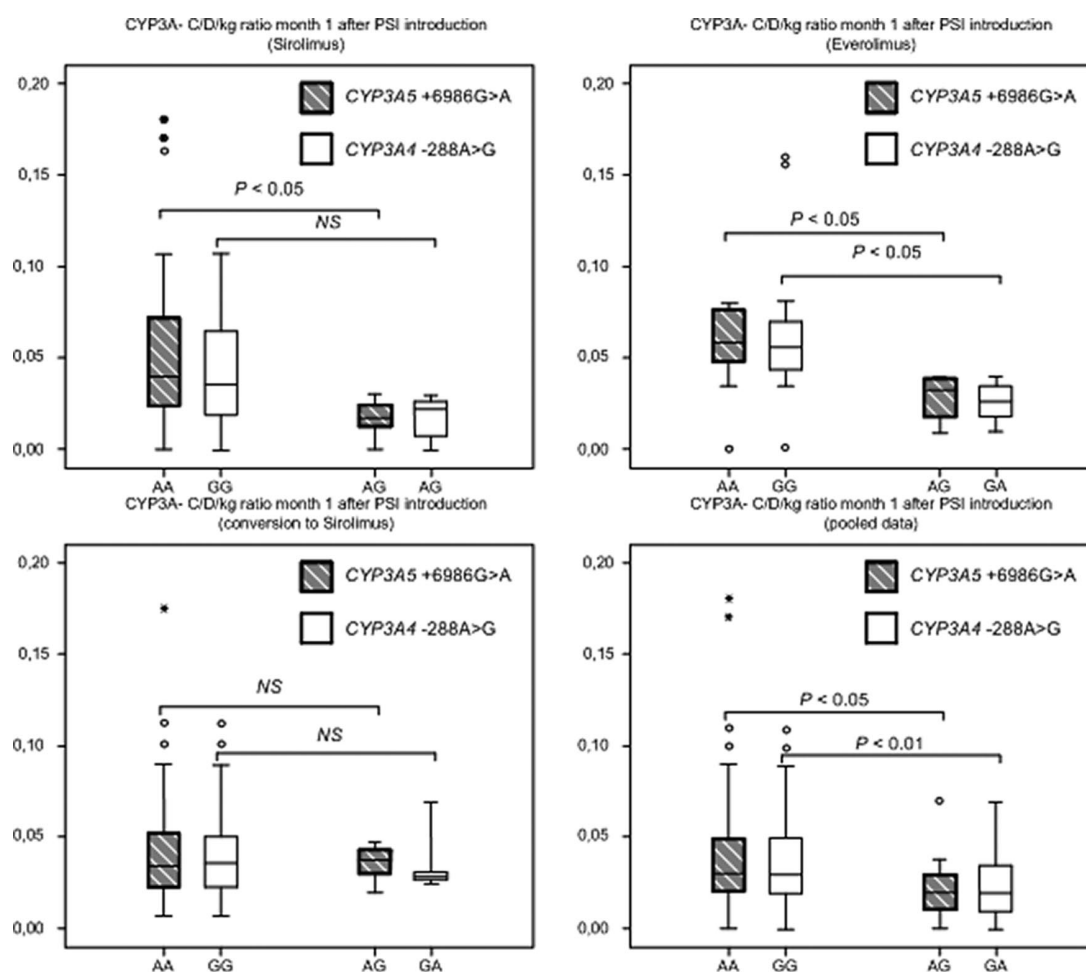
Proliferative signal inhibitors (PSIs), sirolimus and everolimus, represent alternative immunosuppression to calcineurin inhibitors (CNIs) after renal transplantation (1); nevertheless, adverse effects remain an important clinical issue. Mechanisms involved in the side effects of PSI therapy have not been understood fully (2), and their occurrence remains unpredictable. Recently, Aggarwal et al. (3) reported a dose-dependent correlation of

PSI levels and hyperlipidemia, suggesting that side effects of PSI are determined by the drug bioavailability.

In our study, we evaluated the hypothesis that genetic variants in *CYP3A4*, *CYP3A5*, and *MDR1* genes, encoding principal proteins involved in PSI metabolism and trafficking, will determine the extent of proteinuria. We analyzed five functional allelic variants (i.e., *CYP3A5* [6986G>A] [4], *CYP3A4* [-288A>G]

[5], *ABCB1* [1236C>T], 2677G>T/A, and 3435C>T) (6, 7).

A total of 184 white kidney transplant recipients who received sirolimus (Rapamune) or everolimus (Certican) were enrolled in the retrospective, case-control study. PSI was administered de novo in 82 (44.5%) patients; 102 (55.5%) patients underwent conversion from CNI to PSI. In 97 patients (52.7%), CNI was coadministered in 105 (57%) of cases.



**FIGURE 1.** Association of CYP3A polymorphic loci with proliferative signal inhibitor (PSI) bioavailability (C/D/kg) at month 1 after PSI introduction. Note: CYP3A4 (-288AA)/CYP3A5 (6986GG) and CYP3A4 (-288AG)/CYP3A5 (6986GA) denote genotype combinations.

Hyperlipidemia was defined as total cholesterol more than 6 mmol/L and moderate and significant proteinuria as more than 0.5 g/day and more than 1.5 g/day, respectively.

To test genetic association, we analyzed linkage disequilibrium between syntenic loci using the Markov chain modeling (8) and the Expectation-Maximization algorithm. By using a multivariate logistic regression model, we assessed whether haplotypes independently predicted PSI side effects. For the purpose of this study, we pooled data of patients treated with sirolimus and everolimus, because they exert identical pharmacodynamics, have a similar therapeutic window, and both induce a similar spectrum and extent of side effects.

Treatment with PSI was associated with time-dependent side effects in a substantial proportion of patients. After 3 months of therapy, we observed a significant increase in cholesterolemia ( $6.09 \pm 1.40$  vs.  $5.30 \pm 1.26$  mmol/L,  $P < 0.001$ ) and triglyceridemia ( $3.21 \pm 1.76$  vs.  $2.34 \pm 1.13$  mmol/L,  $P < 0.002$ ), compared with baseline. Almost 2-fold increase in proteinuria ( $0.89 \pm 1.08$  vs.  $1.44 \pm 1.88$  g/day,  $P = 0.003$ ) was observed at month 1. The statistical significances of these findings were maintained even after Bonferroni's correction for multiple testing. No significant differences have been found at later time points, which is in agreement with previous reports (9) showing that the side effects shown in our study appeared at the beginning and returned to baseline over time.

We found a significantly weaker linkage disequilibrium within the *CYP3A4-CYP3A5* locus in patients with hypercholesterolemia at month 3 and proteinuria at month 6 after introduction of PSI, compared with individuals without respective side effects. These findings suggested a higher probability of allelic recombination in the CYP locus and prompted us to identify specific CYP3A haplotypes that would explain the association.

We observed that patients demonstrating PSI therapy side effects showed a significantly increased frequency of the *CYP3A4-CYP3A5* AAGA haplotype. Odds ratio (OR) for carriers of the AAGA haplotype for moderate proteinuria ( $P = 0.008$ , OR = 4.87, 95% confidence interval 1.48–16.35) and significant proteinuria at month 6 ( $P = 0.003$ , OR = 6.71, 95% confidence interval 2.08–21.63) indicated a significant role of CYP3A haplotypic ar-

rangement in determination of side effects of PSI therapy.

CYP3A allelic variants were associated with significant differences in PSI bioavailability (blood trough levels, C/D/kg ratio). Pharmacogenetic analysis of *CYP3A4-CYP3A5* haplotypes revealed significant differences in blood levels and C/D/kg ratio at months 1 and 3 (Fig. 1). PSI blood levels at months 1, 3, and 6 correlated with proteinuria at month 6 and with cholesterolemia at month 3.

Taken together, our data suggested that CYP3A haplotypes significantly modulated pharmacokinetics and PSI adverse effects. Multivariate logistic regression, which involved CYP haplotypes, creatinine levels, immunosuppressive therapy, rapamycin level, C/D/kg ratio, and donor age, identified CYP3A haplotypes and PSI blood levels as independent predictors of cholesterolemia higher than 6 mmol/L at month 3 ( $P < 0.01$ ) and proteinuria at month 6 ( $P < 0.05$ ). Contribution of CYP3A haplotypes to accuracy of the prediction model based on receiver operating characteristic analysis was 3.1%, 2.1%, and 1.2% (cholesterolemia, and moderate and significant proteinuria, respectively). None of the evaluated *ABCB1* polymorphic loci determined difference in PSI bioavailability and were not associated with evaluated variables and outcomes.

In conclusion, allelic arrangement in the CYP3A locus is an independent risk factor for the development of PSI-induced proteinuria. This finding suggests a new possibility for identification of patients who may not benefit from PSI-based immunosuppression because of increased risk of therapeutic complications.

Stepan Bandur<sup>1,2</sup>

Jan Petrasek<sup>3</sup>

Petra Hribova<sup>1</sup>

Eva Novotna<sup>1</sup>

Irena Brabcova<sup>1</sup>

Ondrej Viklicky<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Transplant Laboratory, Department of Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine Prague, Czech Republic

<sup>2</sup> Department of Nephrology Institute for Clinical and Experimental Medicine Prague, Czech Republic

<sup>3</sup> Laboratory of Experimental Hepatology, Department of Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine Prague, Czech Republic

This work was supported by the grants NR/8816-3/2006 and MZO 00023001 from the Czech Ministry of Health.

The authors declare no conflict of interest.

Address correspondence to: Ondrej Viklicky, M.D., Ph.D., Department of Nephrology, Transplant Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958, 14021 Prague, Czech Republic.

E-mail: ondrej.viklicky@medicon.cz

S.B. participated in DNA isolation, genotyping, data analysis, and article preparation; J.P. participated in data analysis and article preparation; P.H., I.B., and E.N. participated in DNA isolation and genotyping; and O.V. participated in study design, data analysis, and article preparation.

Received 10 June 2010.

Accepted 1 September 2010.

Copyright © 2011 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/11/0-1

DOI: 10.1097/TP.0b013e3181fa94a0

## REFERENCES

1. Webster ACLV, Chapman JR, Craig JC. Target of rapamycin inhibitors (sirolimus and everolimus) for primary immunosuppression of kidney transplant recipients: A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Transplantation* 2006; 81: 1234.
2. Kasiske BL, de Mattos A, Flechner SM, et al. Mammalian target of rapamycin inhibitor dyslipidemia in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2008; 7: 1384.
3. Aggarwal DFM, Soliman GA. Rapamycin, an mTOR inhibitor, disrupts triglyceride metabolism in guinea pigs. *Metabolism* 2006; 55: 794.
4. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001; 27: 383.
5. Amirimani BNB, Deitz AC, Weber BL, et al. Increased transcriptional activity of the CYP3A4\*1B promoter variant. *Environ Mol Mutagen* 2003; 42: 299.
6. Mourad MMG, Wallemacq P, Garrigue V, et al. Sirolimus and tacrolimus trough concentrations and dose requirements after kidney transplantation in relation to CYP3A5 and MDR1 polymorphisms and steroids. *Transplantation* 2005; 80: 977.
7. Anglicheau DLCD, Lechaton S, Laurent-Puig P, et al. Consequences of genetic polymorphisms for sirolimus requirements after renal transplant in patients on primary sirolimus therapy. *Am J Transplant* 2005; 5: 595.
8. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 2005; 1: 47.
9. Schena FP, Pascoe MD, Alberu J, et al.; Sirolimus CONVERT Trial Study Group. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus maintenance therapy in renal allograft recipients: 24-month efficacy and safety results from the CONVERT trial. *Transplantation* 2009; 87: 233.